



HAL
open science

Etude et réalisation d'un microdispositif magnéto-fluidique pour la capture et la détection de cytokines modèles TNF- α en fluorescence

Etienne Laborie

► **To cite this version:**

Etienne Laborie. Etude et réalisation d'un microdispositif magnéto-fluidique pour la capture et la détection de cytokines modèles TNF- α en fluorescence. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPAST073 . tel-03329589

HAL Id: tel-03329589

<https://theses.hal.science/tel-03329589>

Submitted on 31 Aug 2021

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.

Etude et réalisation d'un microdispositif
magnéto-fluidique pour la capture et la
détection de cytokines modèles TNF- α en
fluorescence

*Study and fabrication of a magneto-fluidic microdevice for
the capture and fluorescence detection of model cytokines*

TNF- α

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°575 : Electrical, Optical, Bio : Physics and Engineering (EOBE)

Spécialité de doctorat : Electronique et Optoélectronique, Nano et Microtechnologies

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Centre de Nanosciences et de Nano-
technologies, 91120, Palaiseau, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 16/07/2021, par**

Etienne LABORIE

Composition du Jury

Benoît PIRO

Professeur, Université Paris-Diderot (ITODYS)

Président du jury

Carole CHAIX

Directrice de recherche, Université de Lyon (ISA)

Rapporteur & Examinatrice

Benoît CHARLOT

Directeur de recherche, Université de Montpellier (IES)

Rapporteur & Examineur

Bruno LE PIOUFLE

Professeur, Université Paris-Saclay (SATIE)

Examineur

Isabelle TURBICA

Professeure, Université Paris-Saclay (INSERM)

Examinatrice

Direction de la thèse

Elisabeth DUFOUR-GERGAM

Professeure, Université Paris-Saclay (C2N)

Directrice de thèse

Mehdi AMMAR

Maître de conférences, Université Paris-Saclay (C2N)

Co-Encadrant & Invité

Claire SMADJA

Professeure, Université Paris-Saclay (IGPS)

Co-Encadrante & Invitée

université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE

Physique et ingénierie:
Electrons, Photons,
Sciences du vivant (EOBE)

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay
2^{ème} étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay
4 avenue des Sciences,
91190 Gif sur Yvette, France

Titre : Etude et réalisation d'un microdispositif magnéto-fluidique pour la capture et la détection en fluorescence de cytokines modèles TNF- α

Mots clés : biocapteur, cytokines, TNF- α , fluorescence, magnéto-fluidique

Résumé : Les cytokines pro-inflammatoires sont des molécules impliquées dans de nombreuses pathologies (cancer, troubles dépressifs, CoViD-19, ...) et présentes dans différents fluides biologiques (sang, sueur, salive, ...). Le développement d'un biocapteur capable d'identifier et quantifier les cytokines dans ces différents fluides constituerait une stratégie très innovante dans le suivi des pathologies pro-inflammatoires. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de développer un dispositif microfluidique intégrant des billes magnétiques fonctionnalisées pour la capture et la manipulation d'une cytokine modèle, le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α). Dans ce dispositif, les billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps capturent le TNF- α au sein d'un circuit microfluidique et sont manipulées par des microbobines intégrées au dispositif. Une chambre fluidique de détection intégrant une surface biofonctionnalisée avec des anticorps anti-TNF- α permet l'immobilisation des immunocomplexes à base de TNF- α qui seront quantifiés par fluorescence. Dans un premier temps, un protocole de fonctionnalisation chimique du PDMS, matériau support du circuit microfluidique, a été développé et optimisé pour la réalisation de la chambre fluidique de détection. Cette fonctionnalisation par amino-silanisation a été caractérisée par différentes techniques physico-chimiques de surface : angle de contact, EDX, AFM, FTIR et microscopie à fluorescence. Les surfaces préparées ont été validées pour la détection par un immunodosage du TNF- α avec une limite de détection de 0.55 $\mu\text{g/mL}$ (31.6 nM) en microscopie à fluorescence. L'intégration en microfluidique de ce procédé a ensuite consisté en un assemblage des surfaces silanisées avec un circuit microfluidique. Un protocole microfluidique de greffage des anticorps a été développé et a permis d'améliorer la qualité de la détection en termes de reproductibilité, rapidité et sensibilité avec une limite de détection de 0.22 $\mu\text{g/mL}$ (12.64 nM) en fluorescence. Dans la deuxième partie de la thèse, l'utilisation de billes magnétiques comme vecteur de capture des cytokines a nécessité de choisir un modèle de billes en adéquation avec l'immunocapture du TNF- α . Dans cette optique, une méthode analytique a été développée par digestion enzymatique et chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permettant de caractériser la qualité de l'immobilisation des anticorps à la surface (densité et orientation des anticorps). Parmi plusieurs modèles de billes (carboxyliques, tosylées, streptavidines et protéines G), les billes protéines G ont montré les meilleures performances avec plus de 70 000 anticorps immobilisés par bille dont 75% d'entre eux spécifiquement orientés pour une capture du TNF- α . Dans la dernière partie de la thèse, un dispositif de contrôle et de capture magnétique des billes protéine G a été élaboré à partir de microbobines de cuivre, encapsulées dans le circuit microfluidique. Celles-ci ont été fabriquées et caractérisées en salle blanche afin de générer un champ magnétique suffisant pour le blocage des billes tout en limitant les effets thermiques dus au courant injecté dans les bobines. La miniaturisation des bobines a permis leur intégration à proximité du circuit microfluidique générant un champ magnétique très localisé compatible avec les dimensions de la chambre de détection. Les dispositifs magnéto-fluidiques réalisés ont été évalués pour des premières expériences de fonctionnalisation des billes magnétiques protéine G par des anticorps fluorescents apportant ainsi la preuve de concept en vue de leur exploitation dans la détection intégrée des cytokines modèles (TNF- α).

Title : Study and fabrication of a magneto-fluidic microdevice for the capture and fluorescence detection of model cytokines TNF- α

Keywords : biosensor, cytokines, TNF- α , fluorescence, magneto-fluidics

Abstract : Pro-inflammatory cytokines are molecules involved in several pathologies (cancer, depressive disorders, CoViD-19, ...) and found in various biological fluids (blood, sweat, saliva...). Developing a biosensor that could identify and quantify cytokines in these fluids represents an innovative approach for the monitoring of pro-inflammatory pathologies. In this context, the objective of this thesis has been to develop a microfluidic device integrating functionalized magnetic beads for the capture and manipulation of the Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), a model cytokine. Inside the device, the capture of TNF- α is performed with magnetic beads functionalized with antibodies inside a microfluidic circuit. The beads are captured and manipulated with integrated microcoils. The device also includes a microfluidic detection chamber biofunctionalized with anti-TNF- α antibodies allowing the immobilization of the magnetic beads-TNF- α immunocomplexes. These complexes are then quantified by fluorescence microscopy. In the first part of the thesis, a chemical functionalization process of PDMS, as constituting material of the microfluidic chip, has been developed and optimized for the fabrication of the detection chamber. This functionalization process relies on an amino-silanization reaction and has been characterized with different physico-chemical techniques: water contact angle, EDX, AFM, FTIR and fluorescence microscopy. The prepared surfaces have been validated with an immunoassay on TNF- α with a limit of detection of 0.55 $\mu\text{g/mL}$ (31.6 nM) in fluorescence microscopy [1]. Next, the microfluidic integration of this process relied on the assembly of silanized surfaces with microfluidic channels. A microfluidic protocol for in-flow antibody grafting has been developed and has improved the detection quality in terms of reproducibility, speed and sensitivity with a limit of detection of 0.22 $\mu\text{g/mL}$ (12.64 nM) in fluorescence microscopy. In the second part of the thesis, the use of magnetic beads as carriers for the capture of cytokines has required to choose a bead type that would support the immunocapture of TNF- α . Therefore, an analytical method has been developed with enzymatic digestion of antibodies and size exclusion chromatography (SEC) for characterizing the antibody immobilization quality on the bead's surface (antibody's density and orientation). Among several beads types (carboxylic, tosylactivated, streptavidin and protein G), protein G beads have shown the best results with more than 70 000 antibody molecules immobilized on the bead and 75% of them specifically orientated for the capture of TNF- α . In the last section of the thesis, a controlling device for the magnetic capture of protein G beads has been fabricated and characterized inside a clean room. This magnetic device generates a magnetic field strong enough for the capture of beads but with limited thermal effects induced by the electric current injected inside the coils. The coils miniaturization allowed their integration in proximity with the microfluidic circuit, generating a highly localized magnetic field, compatible with the microfluidic chamber's dimensions. The fabricated magneto-fluidic devices have been evaluated with a first experiment for the functionalization of protein G beads with fluorescent antibodies, bringing a first proof of concept towards their use in the integrated detection of model cytokines (TNF- α).

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués à l'Institut d'Electronique Fondamentale (IEF) devenu par la suite le Centre de Nanosciences et Nanotechnologies (C2N) après sa fusion avec le Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (LPN), ainsi qu'à l'Institut Galien Paris Sud (IGPS) de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry.

Je tiens à remercier Giancarlo Faini, directeur de l'IEF et du C2N ainsi que toute l'équipe de direction pour m'avoir permis d'y travailler dans de bonnes conditions. Je remercie également Elias Fattal, succédé par Myriam Taverna, à la direction de l'IGPS pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Elisabeth Dufour-Gergam pour avoir accepté la supervision de ces travaux de thèse, pour sa bienveillance, sa gentillesse, sa réactivité et ses précieux conseils lors de nos entretiens.

Je remercie sincèrement Mehdi Ammar et Claire Smadja, mes deux co-encadrants, qui ont suivi mes travaux de près comme de loin. Mehdi, pour m'avoir fait confiance pour porter ce projet de thèse, pour les discussions scientifiques riches et intenses, pour ses conseils, son humour et sa patience. Claire, pour sa bienveillance, sa gentillesse, sa sagesse, son honnêteté et sa disponibilité. Merci à tous les deux pour votre accompagnement.

Je remercie Pierre-Yves Joubert, directeur du département Microsystèmes et Nanobiofluidiques au C2N, et Myriam Taverna, responsable de l'équipe PNAS à l'IGPS, pour m'avoir accueilli dans leur équipe et pour le dévouement complet pour entretenir un environnement de travail agréable au sein du laboratoire.

Au sein du C2N, à tous les permanents indétronables de l'équipe : Alain, Pierre-Yves, Emile, Marion, Fabien, Johan, Philippe, Elie. Une pensée toute particulière à Emile et Marion qui ont partagé mon bureau. Emile, pour son écoute et ses précieux conseils en microfabrication et électronique, son aide pour la réalisation des masques et circuits imprimés, son humour singulier et les BBQ à domicile. Marion, pour la touche supplémentaire d'humanité qu'elle apporte au sein d'une équipe essentiellement masculine, pour son expertise technologique qui m'a grandement aidé pour le dépôt électrolytique ; et au-delà de ses compétences de chercheuse, pour son écoute, sa bienveillance lors de mon accident et de ma césure, ses petites touches gourmandes déposées sur mon bureau.

A ma promotion de thésards du C2N : Sylvie et Giulia, mes coéquipières de Seattle, avec qui j'ai parcouru le paysage nord-américain, pour leur bonne humeur inébranlable, leur énergie communicative. Un grand merci en particulier à Sylvie pour avoir ponctué ces quatre années de rire, de soutien et de taquineries, pour savoir secouer qui il faut quand il faut, et pour s'être toujours rendue disponible pour m'emmener au laboratoire et ailleurs quand c'était nécessaire. Merci également à Alexiane, Lucas & Lucas, Clément, Gwenaël, Claire et Julie avec qui j'ai pu partager de bons moments au laboratoire et au bar. Bravo aux docteur.e.s diplômé.e.s et bon courage aux deux résistantes (Sylvie et Alexiane, 2022 dernier dé lai).

A la nouvelle génération : Paco, Lucas, Charlotte, Imran, Jhordan et Martina. Plein de courage pour les années à venir.

A l'ancienne génération : Adrien, Olivier, Sylvain, Bogdan, Nhung, Alexandra dont la sagesse et l'expérience ont bercé ma première année. Merci en particulier à Olivier pour sa patience, ses enseignements et sa transmission qui m'ont permis de surmonter les difficultés de la salle blanche (et dieu sait qu'elles furent nombreuses), en particulier sur ce sujet de thèse.

Aux ingénieurs « partis trop tôt », Hadrien et Baptiste, sans qui ma première année n'aurait pas eu la même saveur.

A toute l'équipe de la centrale technologique qui a participé de près ou de loin à mon projet : David Bouville, Fabien Bayle, Samson Edmond, Christophe Dupuis, Jean-Luc Cercus, Nathalie Isaac, Abdelmounaim « Abdou » Harouri, Cédric Villebasse, Etienne Herth François Maillard, Xavier Lafosse, Xavier Le Roux, Jean-René Coudeville, Laetitia Leroy, Alan Durnez. Je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie, Abdou et Jean-Luc pour leur infime gentillesse, leur bonne humeur, leur expertise et leur travail acharné. Leur aide a été déterminante pour la réalisation de mes dispositifs durant les derniers mois de ma thèse.

Au sein de l'Institut Galien et de l'équipe PNAS : Myriam, Marie-Claude, Thuy, Duc, qui ont fait et font tenir cette équipe. A leur soutien tant humain, que technique et logistique, qui m'a permis de travailler dans une équipe chaleureuse, où les moments de partage ont été nombreux (et gourmands).

A Corentin et Coralie qui ont rendu mes premiers mois au laboratoire bien plus faciles et m'ont donné un aperçu des difficultés de la dernière année de thèse. A Emilie (#teamELISA), pour sa bonne humeur, sa sensibilité et son soutien inconditionnel au laboratoire et jusqu'au bout de nos doctorats. A Minh qui a eu la patience de m'enseigner les ficelles des techniques analytiques et me guider dans mes expériences. A Sylvie, Marco, Théo, Bin, Kai, Seray, Ajoub, Van Thanh, Joanie avec qui j'ai pu partager de nombreux moments durant mes dix mois au laboratoire et quelques verres, et qui ont rendu mon quotidien plus agréable.

A l'équipe de l'Institut Pierre Gilles de Gennes qui m'a accueilli pendant 6 mois de césure au cours de ma thèse : Olivier, Guillaume, Bertrand, Kévin, Perrine, Manon, Elodie, Céline, Sylvia, Elian, Rolie. Ces six mois à leurs côtés ont contribué à recharger mes batteries et prendre la distance nécessaire pour replonger dans ma thèse, en ayant beaucoup appris tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci plus particulièrement à Michael Tatoulian et Rémi Waché pour m'avoir fait confiance et m'avoir offert une place dans leur équipe de l'Institut Carnot.

A tous mes amis de l'école, dont les doux souvenirs de notre naïveté étudiante ont bercé avec nostalgie les années qui ont suivi notre diplôme. Nombreux sont ceux s'étant risqué à l'épreuve du doctorat, et beaucoup s'en sont sortis avec brio. J'adresse particulièrement mes remerciements les plus sincères à ceux avec qui j'ai pu partager mes difficultés parce qu'ils les comprenaient : Michèle, Quentin, Caroline, Benoît, Jazzman. Merci pour leurs conseils, leur amitié et leur soutien.

Merci à Alexis, dont l'amitié sans faille m'a accompagné depuis plus de 20 ans, et qui m'inspire par sa volonté, sa rigueur et son infime gentillesse. Je lui souhaite plein de courage pour finir cette thèse en sémiotique.

Merci à mes compagnons fanfarons de l'Orchestre PLS qui ont ponctué mes lundis soir de vacarmes mélodieux, taquineries bienveillantes et bières douteuses mais abondantes.

A mes amis et mélomanes de Pelo Pelo : Lucas, Youssef et Vincent, dont le talent, la sensibilité et l'acharnement en répétition chaque dimanche nous ont permis de rêver à quelques occasions sur des scènes parisiennes et de partager notre musique avec le plus grand nombre. Merci à Lucas d'avoir supporté pendant dix ans mes choix d'orientation qui ont parfois limité notre temps pour composer, mais qui n'a jamais cessé de rêver à mes côtés.

A mes (ex-)collocs Vincent et Youssef, sans qui je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. Leur amitié inestimable, leur humour ravageur et leur intelligence ont fait de nos quatre années de vie commune une belle aventure, riche de souvenirs, d'enseignements, d'amour et de partage. Merci également à Aleksandra, Alice et Aziz (les 3 A), collocs par intérim et co-confinés, qui ont enrichi ma vie par leur présence, leur amitié et leur bienveillance. Merci à leur cinq estomac d'avoir accueilli avec enthousiasme un an de gâteaux réalisés durant la préparation de mon CAP Pâtisserie (au grand damne des amis extérieurs).

A ma famille qui m'a toujours soutenu dans les multiples épreuves traversées. Mon père et ma mère qui ont toujours cultivé ma curiosité, mes aspirations, qui m'ont accompagné dans mes choix d'orientation, qui m'ont enseigné l'humilité, la discipline et la curiosité indispensable pour tout chercheur. A mes sœurs dont la sensibilité et l'amour m'ont souvent donné les clés nécessaires pour avancer.

Enfin, je remercie Marianne pour avoir rempli ces quatre années d'amour et de douceur, indispensable pour s'évader dans les moments les plus difficiles, pour son soutien et son regard qui m'ont accompagné et porté tout au long de cette aventure.

" C'est lorsque nous ne sommes plus en mesure de changer une situation que nous sommes mis au défi de nous changer nous-mêmes."

Viktor Frankl

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	9
----------------------------	---

Chapitre 1 – État de l’art

Introduction.....	14
1. Suivi des pathologies inflammatoires	15
1.1. Marqueurs de pathologies inflammatoires : exemple des cytokines	16
1.1.1. Généralités sur les cytokines	16
1.1.2. Pathologies inflammatoires : rôle des cytokines.....	17
1.1.3. Méthodes de mesure du taux de cytokines dans les fluides biologiques	18
1.2. Le TNF- α	19
1.2.1. Généralités	19
1.2.2. Fluides biologiques comprenant du TNF- α	19
1.2.3. Sueur : avantages et perspectives.....	20
1.3. Dispositifs de détection des cytokines	22
1.3.1. Défis de l’analyse des cytokines	22
1.3.2. Techniques de laboratoires utilisées pour la détection des cytokines	24
1.3.3. Intérêt de la miniaturisation et l’utilisation de biocapteurs portables	29
2. Biocapteurs appliqués à la détection des cytokines	30
2.1. Généralités sur les biocapteurs.....	31
2.2. Transducteurs appliqués à l’immunodétection des cytokines.....	33
2.2.1. Détection en fluorescence	33
2.2.2. Autres types de transducteurs	36
2.3. Intégration fluidique et matériaux flexibles.....	40
2.3.1. Thermoplastiques	42
2.3.2. Élastomères	42
2.3.3. Biomatériaux.....	43
2.3.4. Autres matériaux.....	44
2.4. Fonctionnalisation des surfaces de polymères.....	45
2.4.1. En phase liquide.....	45
2.4.2. En phase vapeur.....	51
2.5. Conjugaison des surfaces avec les anticorps	52
2.5.1. Principe de l’immunodosage	52
2.5.2. Techniques de bioconjugaison des anticorps sur une surface.....	54
3. Billes magnétiques : contrôle et manipulation dans les dispositifs microfluidiques .	57
3.1. Généralités sur les billes magnétiques.....	57
3.1.1. Propriétés et structures des billes magnétiques	57

3.1.2. Utilisation des billes magnétiques en tubes pour des analyses biochimique	58
3.2. Utilisation des billes magnétiques pour les analyses biologiques intégrées aux laboratoires sur puce	62
3.2.1. Billes magnétiques : transport, tri et mélange de biomolécules dans les laboratoires sur puce	52
3.2.2. Billes magnétiques : immunodosage dans les laboratoires sur puce	65
3.3. Fabrication de dispositifs de capture et manipulation de billes magnétiques en microfluidique	68
3.3.1. Aimants permanents pour la manipulation/capture des billes magnétiques	68
3.3.2. Électroaimants pour la manipulation/capture des billes magnétiques	70
Conclusion du chapitre 1.....	74
Bibliographie	78

Chapitre 2 - Modification biochimique de surface du PDMS pour l'immunodosage du TNF- α

Introduction.....	96
1. Élaboration et caractérisation des surfaces de PDMS.....	97
1.1. Préparation du mélange de PDMS	97
1.2. Préparation des couches de PDMS	98
1.3. Caractérisation des couches de PDMS	99
1.3.1. Étude de la mouillabilité par mesure d'angle de contact.....	100
1.3.2. Étude de la composition élémentaire de la surface par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)	101
1.3.3. Analyse de la structure chimique de la surface par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	103
1.3.4. Étude de la rugosité de surface par microscopie à force atomique (AFM).....	104
1.3.5. Étude de la réponse fluorescente des surfaces par microscopie optique à fluorescence.....	105
Conclusion intermédiaire de la partie 1	106
2. Fonctionnalisation des couches de PDMS en pleine plaque	107
2.1. Silanisation des couches de PDMS.....	107
2.2. Optimisation des conditions de silanisation et caractérisation.....	108
2.2.1. Étude préliminaire des conditions de silanisation du PDMS	109
Conclusion intermédiaire de la partie 2.2.1	115
2.2.2. Évaluation biochimique des conditions optimisées pour la silanisation du PDMS ...	115
Conclusion intermédiaire de la partie 2.2.....	125
2.3. Greffage des anticorps anti-TNF- α sur les aminosilanes.....	125
2.3.1. Étude de la concentration de la couche d'anticorps de capture	127
2.3.2. Contrôle des performances du PDMS silanisé par rapport au PDMS natif et étude de la spécificité du complexe immunologique.....	129
2.4. Immunodosage du TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisées	132
Conclusion intermédiaire de la partie 2.....	134
3. Biofonctionnalisation du PDMS en conditions microfluidiques	134
3.1. Fabrication des dispositifs fluidiques pour l'immunodosage.....	135
3.1.1. Fabrication des canaux.....	135
3.1.2. Stabilité de la silanisation après scellement des puces	139
3.2. Protection du PDMS contre l'adsorption non spécifique des protéines	140
3.2.1. Description générale du protocole de passivation avec le PEO.....	140
3.2.2. Mise en œuvre du protocole de passivation.....	141
3.2.3. Passivation du capot de PDMS natif pour les puces « contrôles ».....	145
3.2.4. Passivation des canaux	146
3.2.5. Évaluation de la passivation du PDMS en conditions fluidiques.....	147

Conclusion intermédiaire de la partie 3.2.....	148
3.3. Greffage des anticorps sur les surfaces silanisées en conditions fluidiques.....	149
3.3.1. Protocole de greffage avec IgG modèles	150
3.3.2. Optimisation du greffage des anticorps et de la détection	150
3.3.3. Application aux greffages des anticorps de capture anti-TNF- α	153
3.4. Immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques et évaluation des performances..	154
Conclusion du chapitre 2.....	158
Bibliographie	159

Chapitre 3 – Etude du greffage d’anticorps sur des billes magnétiques pour l’immunocapture du TNF- α

Introduction.....	165
1. Billes magnétiques pour le greffage des anticorps	166
1.1. Propriétés des billes magnétiques étudiées	166
1.2. Etude de la bioréactivité des billes	167
1.2.1. Densité de greffage et orientation des anticorps sur les billes	167
1.2.2. Méthodes existantes pour déterminer la bioréactivité des billes	169
2. Développement d’une méthode de caractérisation de la bioréactivité des billes magnétiques.....	175
2.1. Digestion enzymatique des anticorps	175
2.2. Greffage des anticorps sur les billes.....	177
2.3. Analyse par SEC-FLD des fragments d’anticorps.....	177
2.3.1. Validation de la méthode	177
2.3.2. Etude de l’influence des conditions de greffage des billes sur le signal FLD	178
2.3.3. Contribution du signal de l’ <i>Id_eS</i> à la détection FLD	181
2.4. Caractérisation du greffage des anticorps sur les billes magnétiques	184
2.4.1. Estimation de la densité d’anticorps greffés sur les billes	184
2.4.2. Evaluation de l’orientation des anticorps sur les différents types de billes magnétiques	186
3. Application à l’immunodosage et l’immunocapture du TNF-α.....	189
3.1. Immunodosage du TNF- α sur billes Ts et Protéine G.....	189
3.1.1. Immunodosage sur billes Ts.....	190
3.1.2. Immunodosage sur billes Protéine G.....	191
3.2. Immunocapture et élution du TNF- α sur billes Ts, COOH et Protéine G.....	191
Conclusion du chapitre 3.....	194
Bibliographie	195

Chapitre 4 – Fabrication d’un dispositif microfluidique pour la capture de billes magnétiques fonctionnalisées

Introduction	199
1. Réalisation des microbobines de capture	200
1.1. Contexte et dimensionnement des bobines.....	200
1.1.1. Contexte de l’étude	200
1.1.2. Etude du dimensionnement et des effets thermiques des bobines	202
1.2. Présentation générale du procédé de fabrication.....	210
1.2.1. Préparation du substrat de silicium	213
1.2.2. Premier niveau : la sous-piste de cuivre.....	214
1.2.3. Deuxième niveau : isolation de la sous-piste.....	218
1.2.4. Troisième niveau : croissance des bobines de cuivre.....	220
1.2.5. Conditionnement des microbobines	225
1.2.6. Intégration du circuit microfluidique et soudure des fils électriques.....	226
1.3. Fabrication d’un système de capture optimisé avec substrat magnétique.....	228
1.3.1. Micromoulage des bases de Permalloy	229
1.3.2. Isolation électrique des bases de Permalloy	232
2. Caractérisation électrique et fluidiques des dispositifs de capture	235
2.1. Caractérisation électrique des microbobines	235
2.2. Caractérisation thermoélectrique des bobines.....	238
2.3. Caractérisation fluidique des dispositifs	239
3. Application à la capture et à la détection fluorescente de billes magnétiques	240
3.1. Greffage en tube des billes protéine G avec les anticorps fluorescents	241
3.2. Evaluation des conditions de capture des billes par les microbobines.....	242
3.3. Évaluation de la durée de greffage des anticorps sur les billes immobilisées	245
3.4. Greffage et détection des anticorps fluorescents sur les billes immobilisées	247
Conclusion du chapitre 4	249
Bibliographie	250
CONCLUSION GENERALE	251
ANNEXES	255

Glossaire

Ab	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALP	Alkaline phosphatase
APTES	3-aminopropyltri(éthoxy)silane
ARN	Acide ribonucléique
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C2N	Centre de Nanosciences et Nanotechnologies
COC	<i>Cyclic Olefin Copolymer</i>
CRP	Protéine C-Reactive
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
DC	<i>Direct Current</i>
EC	Electrophorèse Capillaire
EDC	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carboxyl
EDX	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
FLD	<i>Fluorescence Laser Detection</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red Spectroscopy</i>
GMI	<i>Giant MagnetoImpedance</i>
HCl	Acide chlorhydrique
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IBE	<i>Ion Beam Etching</i>
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IGPS	Institut Galien Paris Sud
IL	Interleukine
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Chromatographie en phase liquide)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de detection)
LSPR	<i>Local Surface Plasmon Resonance</i>
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MEB	Microscopie électronique à balayage
MES	Acide 2-éthanosulfonique
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Spectrométrie de masse)
MW	<i>Molecular Weight</i>
NA	Non Attribué
OSTE	<i>Off-stoichiometry Thiol-ene</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCB	<i>Printed Circuit Board</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PECVD	<i>Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition</i>
PEG	Poly(éthylène)glycol
PEN	Polyéthylène naphthalate
PEO	Poly(éthylène)oxide
PET	Polyéthylènetéréphtalate
PGMA	Propylene Glycol Methyl Ether Acetate
PI	Polyimide
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>

QCM	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>
RIE	<i>Reactive Ion Etching</i>
RMS	<i>Root Mean Square</i> (moyenne quadratique)
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Chromatographie d'Exclusion Stérique)
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>
S-NHS	Sulfo-N-hydrosulfosuccinimide
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
UV	Ultra-Violet
WCA	<i>Water Contact Angle</i>
XPS	Spectrométrie Photoélectronique X

INTRODUCTION GENERALE

L'évolution des pathologies chroniques et plus particulièrement des pathologies inflammatoires n'a cessé de s'accroître depuis la fin du 20^{ème} siècle. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 400 millions d'individus souffrent aujourd'hui de troubles inflammatoires au sein des sociétés occidentales : cancer, sepsis, Alzheimer, diabète, maladie de Crohn, covid-19, ... Toutes ces pathologies impliquent des dérèglements de l'activité inflammatoire.

Au cœur de cet enjeu de santé majeur se trouvent les mécanismes immunitaires du corps humain avec, comme principal acteur, une famille de protéines : les cytokines. Celles-ci servent de messagères et de médiatrices de la réponse inflammatoire lors de la perception d'une menace par le corps (blessure, stress, virus, bactérie, ...). Il en existe plusieurs dizaines et leur fonctionnement est complexe. Elles sont par ailleurs sécrétées dans différents fluides (sang, salive, urine, sueur...). Aussi, mesurer l'évolution de ces marqueurs permettrait de suivre la réponse inflammatoire et d'en prévoir l'ampleur. Plus particulièrement, développer des outils de mesure en temps réel et en continu des niveaux cytokiniques dans le corps permettrait le suivi des pathologies ainsi que l'évaluation de l'efficacité des traitements administrés.

Les techniques de laboratoire actuelles ne permettent pas des mesures rapides, en continu, peu coûteuses, peu invasives et sans personnel formé. Cependant, le développement des biocapteurs depuis les années 70 avec les progrès des technologies de microfabrication, des biotechnologies et des techniques de détection, offre une alternative prometteuse aux méthodes traditionnelles.

Plus particulièrement, le développement d'un biocapteur sous forme de patch pour la collecte de sueur directement sur la peau permettrait d'assurer un suivi non invasif et en continu des cytokines contenues dans la sueur. Ce patch intégrerait des éléments de télécommunication permettant la collecte d'informations et le suivi à distance de l'activité inflammatoire du patient. Le patch devrait également être flexible pour adhérer à la peau et intégrer différents éléments de reconnaissance permettant une mesure sensible et stable des cytokines dans la sueur. Une conception microfluidique permettrait par ailleurs la manipulation des fluides tout en réduisant les volumes de réactifs et en optimisant les réactions.

Dans cette perspective, des travaux du département Microsystèmes et Nanobiofluidiques du Centre de Nanosciences et Nanotechnologies (C2N), en collaboration avec l'Institut Galien Paris Sud, portent depuis plusieurs années sur la conception de biocapteurs à base d'anticorps et de technologies de détection à base de particules magnétiques fonctionnalisées. L'utilisation d'anticorps permet d'assurer la spécificité de la reconnaissance des biomarqueurs analysés. Les nanoparticules magnétiques servent par ailleurs de support de capture des anticorps, pouvant être manipulées grâce à un champ magnétique externe.

Aussi, l'un des projets portés par le département repose sur la conception d'un immunocapteur sous forme de patch microfluidique assurant la détection de nanoparticules magnétiques après capture des biomarqueurs à l'aide d'anticorps immobilisés à leur surface. Pour aboutir à ce capteur, plusieurs défis technologiques doivent être relevés. Ainsi, les travaux présentés dans ce manuscrit abordent le développement d'un dispositif magnéto-fluidique pour la capture et la détection fluorescente d'une cytokine modèle, le TNF- α . Des billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps vont capturer le TNF- α au sein d'un circuit microfluidique et seront manipulées par des microbobines intégrées au dispositif. Une chambre fluidique de détection intégrant une

surface biofonctionnalisée avec des anticorps anti-TNF- α permettra l'immobilisation des immunocomplexes à base de TNF- α qui seront quantifiés par fluorescence.

Les problématiques soulevées par ce projet de thèse nécessitent une approche pluridisciplinaire, à l'interface de la chimie de surface, de la chimie analytique, de la biochimie et des biotechnologies et des microtechnologies. Ces travaux de thèse ont donc été menés au sein de deux laboratoires regroupant ces différents domaines de recherche : le C2N, pour son expertise sur la conception de microdispositif et de capteurs, permettant notamment l'accès à un environnement de salle blanche ; l'Institut Galien Paris Sud (IGPS) pour son expertise en chimie analytique et biotechnologies pour l'analyse et la séparation de protéines.

Le **chapitre 1** aborde tout d'abord les enjeux de la détection des cytokines dans les troubles inflammatoires *via* l'utilisation de biocapteurs. A la lumière des critères de performance du capteur, les différents éléments nécessaires à sa conception sont détaillés, notamment le choix des biorécepteurs, de la technique de détection (transducteur), du matériau support pour un biocapteur flexible et microfluidique. Différentes techniques permettant de fonctionnaliser les matériaux sont présentées et l'utilisation des billes magnétiques pour améliorer les analyses biochimiques est détaillée. Enfin, la conception de systèmes de manipulation magnétique des billes au sein des laboratoires sur puce est discutée en vue de la réalisation des microbobines du dispositif visé.

Le **chapitre 2** traite du développement d'un protocole de fonctionnalisation de surface de PDMS comme matériau constitutif du biocapteur. Cette fonctionnalisation repose sur une réaction d'aminosilanisation dont les conditions ont été étudiées en détail afin d'aboutir à une modification de surface stable et homogène. Pour cela, différentes techniques de caractérisation physico-chimique de surface sont utilisées. Les performances des surfaces modifiées sont évaluées pour le greffage d'anticorps anti-TNF- α et l'immunodosage du TNF- α en comparaison au PDMS natif non modifié. L'intégration des surfaces dans un environnement microfluidique est ensuite abordée dans le but de réaliser l'ensemble des étapes de quantification du TNF- α au sein de canaux de PDMS à l'aide d'une détection par microscopie en fluorescence.

Puis, le **chapitre 3** s'intéresse au choix des billes magnétiques à utiliser au sein du biocapteur afin de garantir un greffage optimal des anticorps. Plusieurs billes candidates sont comparées et caractérisées à l'aide d'une méthode analytique développée à partir d'une digestion enzymatique et spécifique des anticorps greffés en surface des billes. Les critères de performance des billes sont notamment étudiés en termes de densité de greffage des anticorps en surface et de leur orientation. Les billes sélectionnées sont enfin greffées avec des anticorps anti-TNF- α et évaluées pour la capture du TNF- α en solution et son élution en vue de sa quantification par un protocole d'immunodosage

Enfin, le **chapitre 4** présente le protocole de microfabrication des dispositifs de contrôle des billes magnétiques en salle blanche. Le procédé repose sur une fabrication à plusieurs niveaux de microbobines de cuivre et intègre différentes étapes technologiques. Plusieurs verrous technologiques sont notamment discutés afin d'obtenir des microbobines fonctionnelles pour la manipulation des billes sélectionnées dans le chapitre 3. La suite du chapitre porte sur la caractérisation électrique, thermique et fluide des dispositifs fabriqués en vue de leur application à la capture des billes magnétiques au sein d'une chambre microfluidique. Le greffage d'anticorps fluorescents à la surface des billes immobilisées par les microbobines est réalisé en conditions microfluidiques et les conditions de capture, greffage et détection fluorescente sont évaluées.

Chapitre 1

Etat de l'art

Sommaire

Introduction.....	14
1. Suivi des pathologies inflammatoires.....	15
1.1. Marqueurs de pathologies inflammatoires : exemple des cytokines.....	16
1.1.1. Généralités sur les cytokines	16
1.1.2. Pathologies inflammatoires : rôle des cytokines.....	17
1.1.3. Méthodes de mesure du taux de cytokines dans les fluides biologiques	18
1.2. Le TNF- α	19
1.2.1. Généralités.....	19
1.2.2. Fluides biologiques comprenant du TNF- α	19
1.2.3. Sueur : avantages et perspectives.....	20
1.3. Dispositifs de détection des cytokines.....	22
1.3.1. Défis de l'analyse des cytokines.....	22
1.3.2. Techniques de laboratoires utilisées pour la détection des cytokines	24
1.3.3. Intérêt de la miniaturisation et de l'utilisation de biocapteurs portables.....	29
2. Biocapteurs appliqués à la détection des cytokines.....	30
2.1. Généralités sur les biocapteurs	31
2.2. Transducteurs appliqués à l'immunodétection des cytokines.....	33
2.2.1. Détection en fluorescence.....	33
2.2.2. Autres types de transducteurs	36
2.3. Intégration fluide et matériaux flexibles.....	40
2.3.1. Thermoplastiques	42
2.3.2. Élastomères.....	42
2.3.3. Biomatériaux	43
2.3.4. Autres matériaux.....	44
2.4. Fonctionnalisation des surfaces de polymères	45
2.4.1. En phase liquide	45
2.4.2. En phase vapeur.....	51
2.5. Conjugaison des surfaces avec les anticorps	52
2.5.1. Principe de l'immunodosage.....	52
2.5.2. Techniques de bioconjugaison des anticorps sur une surface	54
3. Billes magnétiques : contrôle et manipulation dans les dispositifs microfluidiques .57	
3.1. Généralités sur les billes magnétiques.....	57
3.1.1. Propriétés et structures des billes magnétiques.....	57

3.1.2. Utilisation des billes magnétiques en tubes pour des analyses biochimiques	58
3.2. Utilisation des billes magnétiques pour les analyses biologiques intégrées aux laboratoires sur puce.....	62
3.2.1. Billes magnétiques : transport, tri et mélange de biomolécules dans les laboratoires sur puce	62
3.2.2. Billes magnétiques : immunodosage dans les laboratoires sur puce	65
3.3. Fabrication de dispositifs de capture et de manipulation de billes magnétiques en microfluidique	68
3.3.1. Aimants permanents pour la manipulation/capture des billes magnétiques.....	68
3.3.2. Électroaimants pour la manipulation/capture des billes magnétiques.....	70
Conclusion.....	74
Bibliographie.....	78

Introduction

Dans ce chapitre, nous procéderons tout d'abord à un rappel sur les pathologies inflammatoires et la nécessité de développer de nouvelles stratégies de suivi, en particulier autour des biomarqueurs spécifiques de l'inflammation, à savoir les cytokines.

Puis nous présenterons plus en détail le rôle de l'une d'elles, le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), ainsi que les perspectives de sa détection dans différentes matrices biologiques, et plus particulièrement la sueur pour faciliter le suivi en continu des troubles inflammatoires.

Nous aborderons alors l'intérêt de développer des biocapteurs portables de type patch appliqués au suivi des cytokines dans la sueur, de leur fonctionnement jusqu'à leur conception.

Enfin, nous introduirons l'intérêt de l'utilisation des billes magnétiques comme support de capture des cytokines par l'immobilisation d'anticorps spécifiques à leur surface. Nous détaillerons leurs utilisations dans les laboratoires sur puce pour finir par présenter les systèmes de manipulation des billes magnétiques intégrés en microfluidique.

1. Suivi des pathologies inflammatoires

Depuis la fin des années 90, le nombre de patients souffrant de maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies respiratoires, les maladies auto-immunes et le cancer n'a cessé d'augmenter. Le rôle de l'inflammation dans ces pathologies a été clairement établi, et plus particulièrement l'inflammation chronique [1,2]. Les patients présentent dans ces cas-là une activité inflammatoire excessive et prolongée qui touche de nombreux organes (cœur, poumons, foie, pancréas, cerveau, intestins, ...) [3–5]. L'Organisation Mondiale de la Santé considère les troubles inflammatoires comme une menace majeure pour la santé humaine. En 2010, la prévalence de troubles inflammatoires dans les sociétés occidentales était évaluée entre 5 à 7 % de la population. A titre d'exemple, on estime que 2 millions d'européens sont atteints de troubles inflammatoires chroniques de l'intestin, entraînant des dépenses de santé de plusieurs milliards d'euros par an [6,7]. Le suivi et le traitement de ces troubles inflammatoires constituent donc des enjeux de santé majeurs pour les années à venir.[8]

Pour comprendre l'origine des pathologies inflammatoires, il est d'abord nécessaire de connaître le fonctionnement de l'inflammation dans le corps humain. L'inflammation est un mécanisme de défense inné lié à notre immunité. Généralement, il intervient lorsque le système immunitaire détecte une menace extérieure ou un dommage (coup, blessure, ...). L'inflammation peut alors être qualifiée d'aigüe ou chronique en fonction de son intensité et la vitesse de son évolution.

L'inflammation aigüe survient rapidement et devient très vite importante en se prolongeant sur plusieurs heures à quelques jours. L'inflammation chronique en revanche résulte d'un processus inflammatoire plus lent et se prolonge sur plusieurs mois voire années. Elle dépend généralement de la capacité du corps humain à se réparer ou à se débarrasser de la menace identifiée. C'est ce type d'inflammation qui peut être particulièrement nocif au corps humain, qui réagit alors comme s'il était soumis à une menace perpétuelle.

Les mécanismes de déclenchement de la phase inflammatoire sont bien connus et décrits dans de nombreuses publications [9,10]. Brièvement, lors de la détection d'une menace extérieure ou d'un dommage dans le corps humain, les cellules du système immunitaires (macrophages, cellules dendritiques) vont déclencher une cascade de processus inflammatoires nécessaires pour contenir la menace et promouvoir la guérison. Ces mécanismes incluent la sécrétion de protéines particulières, les cytokines, au niveau local dans la zone de danger et/ou systémique, c'est-à-dire au niveau global de l'organisme. Ces cytokines servent alors de messager pour réguler l'activité d'autres cellules du système immunitaire nécessaires à la réparation et à la protection du corps humain. Il s'agit ici de la première ligne de défense immunitaire, qui, à court terme, permet de protéger l'hôte. Cependant, des perturbations de ces mécanismes de reconnaissance et de sécrétion peuvent entraîner une prolongation de cette phase inflammatoire qui finit par endommager les organes et le système immunitaire. Selon la localisation de l'inflammation, des défaillances peuvent survenir au niveau cardiaque, pulmonaire, intestinal, cérébral, etc.

Ainsi, le rôle des cytokines en tant que médiateurs de l'activité inflammatoire est essentiel dans la compréhension et le suivi de ces pathologies. Il convient alors de s'intéresser plus en détail à cette classe de molécules.

1.1. Marqueurs de pathologies inflammatoires : exemple des cytokines

1.1.1. Généralités sur les cytokines

Les cytokines sont des protéines ou glycoprotéines (MW= 8 - 50 kDa) de signalisation cellulaire synthétisées principalement par les cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes, cellules dendritiques, neutrophiles,...) mais aussi par différentes cellules ou tissus [11]. Elles agissent à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles vont coordonner la communication entre les cellules du système immunitaire et altérer les processus neurochimique et neuroendocrinien, modifiant ainsi la physiologie et le comportement de l'hôte. Leur fonctionnement est similaire aux hormones en agissant sur les réponses physiologiques *via* des interactions ligands-récepteurs et peuvent agir localement ou à distance. En se liant à une cellule, une cytokine peut induire une activation, une prolifération, une différenciation ou la mort de la cellule. Contrairement aux hormones qui sont produites par des cellules/glandes spécialisées, les cytokines sont produites par plusieurs types de cellules différentes, peu spécialisées, et pénètrent très rarement dans la circulation sanguine pour provoquer des réactions systémiques (exception faite du TNF- α et de certaines interleukines).

L'expression de « cascade cytokinique » est régulièrement employée car une cytokine pourra induire la production ou la régulation d'une autre cytokine, qui à son tour aura ce rôle. Cela aura pour conséquence un ensemble de réactions en chaînes qui réside au cœur de la régulation de l'activité inflammatoire mais dont les dysfonctionnements peuvent rapidement mener à une situation pathologique.

Il existe plusieurs classes de cytokines, dont certaines sont pro-inflammatoires tandis que d'autres sont anti-inflammatoires. Parmi les familles de cytokines, on retrouve notamment les interleukines (*IL*), les facteurs de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, *TNF*), les facteurs de croissance de transformation (*TGF*), les interférons et les chimiokines.

L'interleukine-1 (*IL-1*), l'interleukine-6 (*IL-6*) et le TNF- α ont des propriétés pro-inflammatoires en stimulant la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, qui tuent les pathogènes pénétrant dans le corps lors de blessure physique. Ces cytokines stimulent aussi la perméabilité vasculaire et l'adhésion cellulaire, permettant aux cellules immunitaires de migrer vers les tissus infectés depuis les vaisseaux sanguins où ils pourront neutraliser les pathogènes. Les cytokines ont également des effets spécifiques sur le corps humain, généralement reconnus comme signes d'inflammation : rougeurs, chaleurs, gonflement et douleur aux sites d'infection. À un niveau plus global, certaines cytokines, les *IL-6*, induisent la production de la protéine de phase aigüe, la protéine C-réactive (*CRP*), un biomarqueur essentiel de l'inflammation. Avec les cytokines, la protéine *CRP* provoque une hausse de la température corporelle (fièvre), du rythme cardiaque, de la respiration. Ensemble, ces effets accélèrent le processus de guérison et limitent la propagation de l'infection. Sur le comportement, ils induisent un état de vigilance, d'anxiété et de retrait social, qui aide l'organisme à récupérer et réduit la probabilité que l'infection ne se répande chez les proches dans l'environnement [10].

Ainsi, les cytokines permettent d'assurer une bonne coopération des différentes cellules du système immunitaire, d'optimiser la communication et de réguler l'intensité et la vitesse des réactions immunitaires. Ces mécanismes sont rigoureusement contrôlés pour éviter qu'ils ne se retournent contre l'individu. Les réactions doivent être : (i) spécifiques pour être orientées

uniquement vers la menace et non contre les cellules de l'hôte ; (ii) adaptées pour correspondre à la gravité de la menace [4].

Il apparaît alors évident que l'ensemble de ces mécanismes inflammatoires résultent d'un équilibre entre les différentes cytokines. Cependant, si cette activité inflammatoire est mal régulée et se prolonge, des lésions et nécroses peuvent survenir aux sites d'actions des cytokines puis provoquer des dommages plus généralisés pour l'hôte avec l'apparition de pathologies chroniques. De même, les niveaux de cytokines dégèrent parfois si rapidement que cela peut être mortel pour le patient : c'est l'« orage cytokinique »[12,13].

1.1.2. Pathologies inflammatoires : rôle des cytokines

En raison de la dysrégulation de l'inflammation ou l'impossibilité d'éliminer la cause de l'inflammation, l'activité inflammatoire devient chronique. Les taux de cytokines se maintiennent alors à des niveaux plus élevés que la moyenne et de nombreuses pathologies chroniques y sont étroitement liées.

Des liens ont été établis entre cancer et inflammation en relation avec les cytokines [14,15]. En effet, l'inflammation provoque la production de cytokines impliquées dans la tumorigenèse. Les cytokines sont également directement impliquées dans les réactions immunitaires qui sous-tendent la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, et plus particulièrement le TNF- α et les interleukines 1 et 10 [16]. Plusieurs troubles dermatologiques impliquent également les cytokines, comme le psoriasis [17] ou le vieillissement de la peau [18]. Les traitements les plus prometteurs pour les cas de psoriasis sévères ou de polyarthrite rhumatoïde impliquent par ailleurs l'utilisation d'anticorps anti-TNF- α (*inflixumab*, *étanercept*, *adalimumab*), anti-IL-12/23 (*ustekinumab*) ou encore anti-IL-17 (*sécukinumab*).

Les cytokines sont également impliquées dans les maladies cardiovasculaires [19], le diabète [20], l'ostéoporose [21], le syndrome de l'intestin irritable [22], la maladie d'Alzheimer [23] ou encore le sepsis [24].

Plus récemment, des taux anormalement élevés de cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1) ont été identifiés chez les patients contaminés par le SARS-CoV-2 [12,25–28], avec l'implication de la cascade de cytokines précédemment mentionnée dans l'aggravation rapide de l'état des patients après la période d'incubation du virus.

Par ailleurs, l'inflammation n'est pas toujours causée par une blessure ou un pathogène extérieur. Une hausse des taux de cytokines est observée dans le corps humain après une activité physique intense [29], leurs rôles étant essentiels dans la réparation des tissus endommagés par l'effort physique (inflammation) et la récupération.

Plus surprenant encore, depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont démontré un lien entre l'activité inflammatoire et les troubles dépressifs [10,30,31]. Les patients souffrant de troubles dépressifs majeurs présentent un taux sanguin élevé en cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α , CRP) dans le sang et dans le liquide céphalorachidien [32–34]. Plusieurs études montrent que la présence d'IL-1 β , IL-6, TNF- α et protéine CRP dans le sang peuvent constituer des marqueurs prédictifs chez les patients dépressifs [4]. De même, l'administration de ces cytokines chez des individus non dépressifs a provoqué l'apparition de symptômes dépressifs. Par ailleurs, l'administration de traitement anti-inflammatoires inhibant la production de ces cytokines a permis de diminuer les symptômes dépressifs chez certains profils de patients [35].

En conclusion, un lien est clairement établi entre pathologies chroniques actuelles et un dérèglement des cytokines. La nécessité de suivre les teneurs en cytokines dans l'organisme et de développer des outils de suivi de l'activité inflammatoire est réelle. Alternativement, l'administration de cytokines ou d'anticorps dirigés contre certaines cytokines, constituent des pistes de traitement pour de nombreuses pathologies afin de rétablir des niveaux cytokiniques sains [36,37].

1.1.3. Méthodes de mesure du taux de cytokines dans les fluides biologiques

Il existe à ce jour peu de méthodes efficaces pour le suivi de l'activité inflammatoire et en particulier de l'inflammation chronique. Le diagnostic n'est effectué que lorsque l'inflammation a lieu en association avec d'autres pathologies.

Il existe actuellement deux types de tests sanguins rapides et peu chers pour le suivi de l'inflammation. Le premier est le dosage de la protéine CRP, qui, nous l'avons vu, est sécrétée lors de la première phase inflammatoire. Le deuxième test régulièrement effectué est le dosage du fibrinogène qui est un facteur de coagulation sanguine. Des niveaux élevés de protéine CRP (> 6 mg/mL) et/ou de fibrinogène (> 4 g/L) indiquent une activité inflammatoire importante. Cependant ces tests ne sont pas suffisamment spécifiques pour l'étude de l'inflammation chronique car les taux de protéine CRP et de fibrinogène augmentent également lors de la phase aigüe de l'inflammation, après une blessure ou maladie récente.

En ce qui concerne les cytokines, les pathologies inflammatoires chroniques impliquent généralement plusieurs cytokines ; il est donc nécessaire d'être capable de mesurer les concentrations de différentes cytokines dans un seul échantillon biologique [38]. En précisant la nature et la concentration de ces différents biomarqueurs, il serait possible de mieux comprendre la nature de l'inflammation et sa cause. C'est notamment la stratégie récemment soutenue par Yang *et al* [13], Mandel *et al* [39] ou encore Del Valle *et al* [28] afin d'identifier un panel de cytokines chez les patients atteints de la CoViD-19. En suivant l'évolution de ce panel représentatif de l'infection virale, il serait possible de prédire l'évolution de la pathologie et de mieux définir la stratégie de traitement.

Bien qu'il existe une variété de techniques de dosage des cytokines comme nous le verrons dans la partie 1.3, il n'existe pas à ce jour de test standardisé et généralisé pour le dosage des cytokines. Aussi, le développement de dispositif de mesure des niveaux cytokiniques constitue un enjeu majeur dans le suivi des troubles inflammatoires chroniques. De même, il pourrait permettre de suivre l'évolution des patients sous traitements afin de s'assurer de l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire, appliqué par exemple à l'une des pathologies précédemment citées.

A titre d'exemple, nous nous sommes intéressés dans cette thèse à la détection et la quantification d'une cytokine particulière, le TNF- α .

1.2. Le TNF- α

1.2.1. Généralités

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire présentant une large gamme d'activités biologiques que nous allons détailler. Il a été originellement identifié comme un agent antitumoral induisant la mort cellulaire (apoptose) des cellules atteintes, ce qui lui a valu son appellation [11]. C'est une molécule de 17 kDa mais qui adopte une structure en trimère en solution (51 kDa). Une altération dans cette structure trimérique impacte fortement son activité biologique.

Le TNF- α est principalement produit par les macrophages, les lymphocytes B et T et les adipocytes. Il favorise l'inflammation, la production d'autres cytokines, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la protection contre les infections.

La production de TNF- α dans l'organisme entraîne une variété d'effets biologiques qui, en cas de dérèglement, entraînent de nombreuses pathologies. L'ouvrage de Thomson et Lotze [11] présente en détails la variété des effets et pathologies induits par le TNF- α , bien que la liste ne soit pas exhaustive et que de nombreuses études démontrent son implication dans différentes pathologies. Par ailleurs, la variété des sources de production de cette cytokine et la complexité de son rôle multiplient les matrices biologiques dans lesquelles il est retrouvé.

1.2.2. Fluides biologiques comprenant du TNF- α

A ce jour, le TNF- α a été retrouvé dans plusieurs fluides biologiques : le sang, les larmes, la salive, le sperme et la sueur. Cette diversité de fluides s'explique notamment par la capacité de production de cytokines par les différentes cellules en contact avec ces fluides (adipocytes, macrophages, lymphocytes, ...). L'inflammation pouvant se manifester localement ou de façon systémique, les zones de sécrétion de TNF- α sont multiples. Les sources les plus fréquentes sont généralement le sérum et le plasma sanguin du fait de leur contact étroit avec la plupart des tissus et organes du corps. Leur composition reflète ainsi l'état global du fonctionnement de l'organisme et donc du patient. Par ailleurs, les contenus des fluides autres que le sang sont en partie issus du partitionnement du plasma sanguin ; ce qui explique la corrélation entre le niveau plasmatique et les concentrations dans les autres fluides biologiques [40]. Cependant, certains fluides présentent aussi des marqueurs plus spécifiques au niveau local (fluide synovial, liquide céphalo-rachidien, ...). Il est aussi possible d'extraire les cytokines fixées sur les cellules ou tissus à partir du surnageant de cultures cellulaires ou de lysas cellulaires. Cependant, ces milieux contiennent également beaucoup de lipides, de collagène et autres protéines structurelles qui occasionneront une baisse de la sensibilité des techniques de dosage. Le TNF- α a ainsi été retrouvé dans :

- Les larmes : des teneurs plus élevées en TNF- α ont pu être mesurées dans les larmes de patients souffrant de maladie de Parkinson [41] et de rétinopathie diabétique [42] par rapport à des sujets sains ;
- La salive : chez des patients atteints de leucoplasie orale, des concentrations plus élevées en TNF- α ont été mesurées par rapport à des sujets sains [43]. Par ailleurs, Bellagambi *et al* [44] se sont appuyés sur la présence de TNF- α dans la salive pour développer un biocapteur électrochimique en vue du diagnostic de patients sujets à des crises cardiaques ;
- Le sperme : des teneurs élevées en TNF- α et IL-6 ont été mesurées dans le sperme de patients souffrant d'inflammation de la prostate ou de douleurs pelviennes chroniques [45] ;

- La sueur : Hladek *et al* [46] ont démontré la faisabilité de la collecte de sueur pour la quantification des cytokines dont le TNF- α comme alternative aux prélèvements sanguins, urinaires ou salivaires plus contraignants. De même, Marques et Cizza [33,34] ont établi une corrélation entre les teneurs en cytokines dans le plasma et dans la sueur chez des sujets sains et patients dépressifs. Les concentrations relevées étaient comparables entre le plasma sanguin et la sueur avec des différences notables entre sujets sains et sujets souffrants de troubles dépressifs majeurs (voir Tableau 1 - 1).

Tableau 1 - 1. Concentrations en cytokines dans le plasma sanguin et la sueur de sujets sains et dépressifs, selon l'étude de Cizza *et al* [33]

Analytes	Concentration dans le plasma (pg/mL)		Concentration dans la sueur (pg/mL)	
	<i>Sujets sains</i>	<i>Sujets dépressifs</i>	<i>Sujets sains</i>	<i>Sujets dépressifs</i>
<i>IL-1α</i>	5.9	52.6	7.6	57.5
<i>IL-1β</i>	10.5	139.9	10.9	160.5
<i>IL-6</i>	7.8	101.8	10.4	133.8
<i>TNF-α</i>	11.1	158.8	12.8	177.9

Ces résultats montrent que l'analyse de la sueur constitue une alternative prometteuse à l'analyse sanguine plus invasive pour la détection et la quantification des cytokines.

Ainsi les cytokines sont présentes dans de nombreux fluides biologiques, dans des teneurs comparables au plasma sanguin, résultant en partie ou entièrement du partitionnement du plasma. Ces concentrations de l'ordre du pg/mL constituent une limite de détection à atteindre pour toute méthode de quantification suffisamment sensible pour la détection et la quantification des cytokines. Enfin, l'analyse de la sueur semble offrir une alternative moins contraignante par rapport aux autres prélèvements ; ce qui en fait une matrice de choix pour un biocapteur non invasif appliqué au suivi du TNF- α . Nous présenterons dans la partie suivante les avantages de l'analyse de la sueur par rapport aux autres fluides et les implications pour la conception d'un biocapteur de la sueur.

1.2.3. Sueur : avantages et perspectives

➤ Les avantages de la sueur

Dans le cadre de l'analyse de biomarqueurs, la collecte de sueur offre plusieurs avantages par rapport aux autres fluides biologiques (sang, urine, salive) dont le prélèvement peut parfois s'avérer difficile. La collecte de sang est la plus invasive, voire dangereuse pour les hémophiles, nouveau-nés et personnes âgées, et nécessite du personnel formé avec du matériel adapté. Pour l'urine, l'intervalle d'échantillonnage est de 24h pour les protéines inflammatoires et l'échantillon doit être conservé au froid et transporté au laboratoire par le patient. Enfin, la salive nécessite d'être collectée plusieurs fois par jour et les analyses peuvent être perturbées par des maux de dents ou de gencives, très fréquents chez les patients plus âgés. La collecte de sueur est aussi plus confortable, la collecte de salive pouvant provoquer des syndromes de bouche sèche, de yeux secs pour les larmes, des hématomes pour les prises sang... [47]

Par ailleurs, la sécrétion des biomarqueurs inflammatoires suit généralement un rythme diurne, ce qui impose aux patients des horaires de collecte et de tests précis, augmentant la charge pour l'individu testé. La sueur présente ainsi l'avantage d'être moins dépendante du rythme circadien, non-invasive et ne nécessite pas de personnel formé ou de matériel complexe. C'est donc un fluide biologique particulièrement avantageux pour l'étude des phénomènes inflammatoires et des maladies chroniques.

Du point de vue de l'échantillon, la sueur demande moins de prétraitement que des échantillons de sang ou de plasma où de nombreuses molécules sont présentes (plaquettes, albumine, etc.). De plus, la collecte de sueur se faisant directement sur la peau, il y a moins de perte et d'altération de l'échantillon par rapport aux autres fluides biologiques. Cependant, les volumes récoltés sont souvent très faibles ($\sim\mu\text{L}$).

Ainsi, le développement de capteurs portables placés sur la peau permet un suivi autonome et en continue de la sueur. Il existe plusieurs formats de capteur déjà développés : le patch [48–53], les « tatouages » [54–56], les vêtements connectés [57,58], les bracelets [59] ou bandeaux frontaux [60]. Ces dispositifs permettent de combiner l'ensemble des étapes d'analyse en un objet.

➤ Les capteurs de type patch

Dans le cadre du projet encadrant ces travaux de thèse, l'objectif porte sur le développement d'un biocapteur de type patch pour le suivi du $\text{TNF-}\alpha$ dans la sueur. Ce format de biocapteur est constitué d'un substrat flexible permettant un contact direct avec la peau, requérant un volume minimal de sueur pour assurer la collecte et l'analyse des biomarqueurs. L'utilisation de matériau flexible et adhésif améliore la résistance mécanique tout en assurant une proximité du capteur avec la zone de collecte de sueur et un scellage étanche du dispositif. Ainsi l'évaporation de la sueur et la contamination du mélange sont évitées [61]. Le choix du substrat de base est donc fondamental pour répondre aux contraintes mécaniques imposées par une utilisation épidermique du capteur. Nous détaillerons dans la partie 2 de ce chapitre les stratégies d'intégration de matériaux flexibles au sein des biocapteurs.

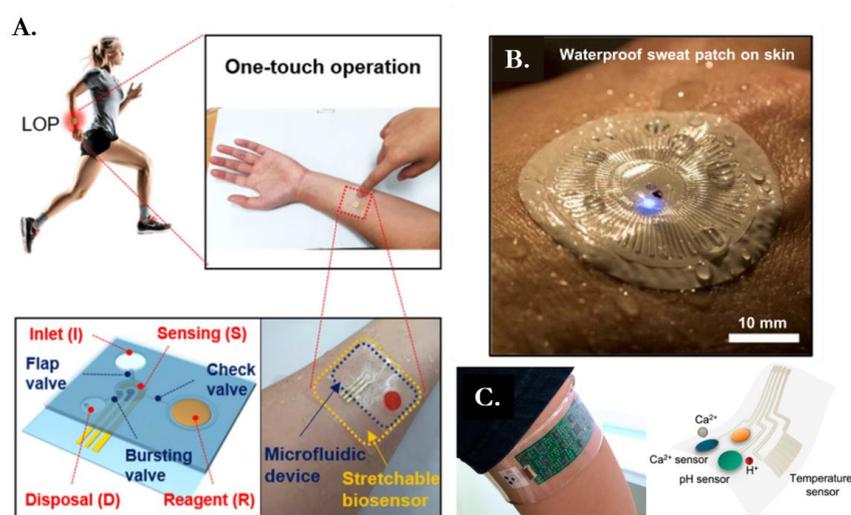


Figure 1 - 1. Exemples de dispositifs de type patch pour l'analyse de la sueur : **A.** Capteur électrochimique pour la détection du cortisol dans la sueur [49] ; **B.** Capteur colorimétrique pour le suivi des ions Cl^{-} dans la sueur [53] ; **C.** Capteur électrochimique pour le suivi des ions Ca^{2+} et du pH de la sueur [62]

La Figure 1 - 1 présente quelques exemples de capteurs sous forme de patch pour le suivi de molécules simples (ions ou hormones). A ce jour en revanche, ce type de dispositif n'a toujours pas été appliqué à la détection de cytokines.

1.3. Dispositifs de détection des cytokines

Dans la partie précédente, nous avons établi l'intérêt du suivi des niveaux de cytokines dans l'organisme et les avantages conférés par la sueur pour accéder à ce type de biomarqueurs dans le cas de pathologies inflammatoires.

Par ailleurs, l'analyse des cytokines est un domaine de recherche nécessitant de relever de nombreux défis que nous définirons dans cette partie. Nous présenterons également les différentes techniques d'analyse utilisées à ce jour en laboratoire. Enfin, la transposition de ces analyses de routine vers la collecte en continu d'un fluide biologique comme la sueur est un enjeu technologique se situant au cœur de la miniaturisation et de la conception de biocapteurs.

1.3.1. Défis de l'analyse des cytokines

En s'intéressant à l'analyse et la quantification des cytokines dans l'organisme, il est nécessaire de relever plusieurs défis inhérents à cette famille de molécules.

➤ Les effets de matrice

Comme illustré dans la partie 1.2.2, les sources de cytokines sont multiples. En fonction de l'origine biologique des échantillons, différentes difficultés peuvent survenir, notamment lors des étapes de prétraitement des échantillons.

En effet, les cytokines étant présentes à des concentrations très faibles (\sim pg/mL), leur quantification nécessite une très grande sensibilité et spécificité des techniques utilisées. Certains milieux contiennent de nombreuses autres molécules en concentration plus importantes qui perturbent l'analyse : lipides, protéines structurales, cellules, résidus de médicaments... Ces molécules peuvent se fixer sur les éléments de reconnaissance et occasionner un bruit de fond important, réduisant les limites de détection atteignables. De même, d'autres composants peuvent altérer la biodisponibilité des cytokines en solution [38].

➤ L'absence de standard

Pour les tests de laboratoires, la difficulté réside également dans l'absence de standard fiable. Souvent les réactifs fournis par les fabricants de kit de dosage sont des réactifs recombinants ou synthétiques montrant de grande variation d'un fabricant à l'autre. Ces disparités empêchent des corrélations fiables entre les concentrations finales obtenues par les différents tests et entre différentes équipes [63].

➤ La fragilité des échantillons

Certaines cytokines sont très sensibles aux manipulations et aux conditions de stockage. Des variations importantes entre échantillons fraîchement analysés et après congélation pendant plusieurs années ont ainsi été démontrés [38]. D'autres cytokines existent sous plusieurs isoformes ; ce qui nécessite de valider la spécificité de la détection pour s'assurer de la forme détectée.

➤ La complexité des mécanismes cellulaires

Malgré le grand nombre d'études portant sur le rôle des cytokines et leur implication dans différentes pathologies, les mécanismes de contrôle de la production des cytokines sont encore méconnus et restent un des grands défis de l'immunologie [64]. Les cytokines sont effet présentes en très grand nombre, avec de multiples effets et fonctions possibles. Leurs sources sont variées et la présence de plusieurs de leurs récepteurs dans les échantillons biologiques peut grandement altérer leur concentration, les rendant parfois impossible à quantifier [38].

Ainsi, pour résumer, les cytokines sont des molécules présentes à de très faibles concentrations nécessitant des techniques analytiques particulièrement sensibles. Par ailleurs, elles existent en très grand nombre et sous différentes formes ; ce qui requiert une très bonne sélectivité et spécificité des analyses. De même, elles possèdent un fonctionnement complexe et en réseau selon différentes voies de signalisation, où chaque cytokine influence les concentrations des autres cytokines. Cela a pour conséquence de modifier rapidement la dynamique de régulation des niveaux de cytokines dans les différents fluides biologiques, nécessitant le développement de techniques d'analyse rapide, voire en temps réel, et capables de réaliser des mesures en parallèle de plusieurs cytokines (multiplexe) sur d'importantes gamme de concentration. Liu *et al* [65] ont ainsi résumé ces différents défis et les besoins qui en résultent sur la Figure 1 - 2. Parmi la variété de techniques disponibles, les techniques basées sur la détection immunologique (à base d'anticorps) des cytokines semblent répondre à plusieurs des défis posés.

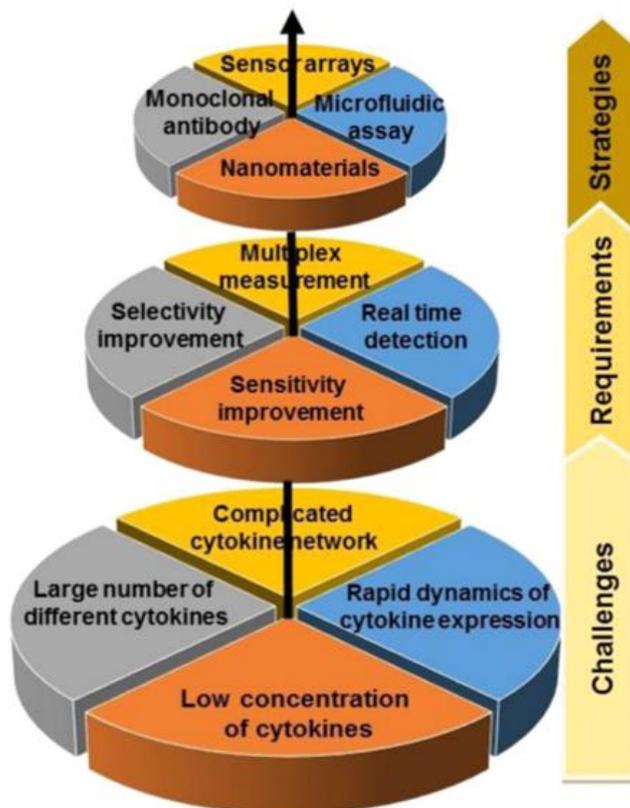


Figure 1 - 2. Résumé des défis et besoins dans l'analyse des cytokines (adapté de [65])

1.3.2. Techniques de laboratoires utilisées pour la détection des cytokines

Dans cette partie, nous allons aborder les différentes techniques actuellement utilisées pour la détection et la quantification des cytokines. Parmi les techniques les plus employées, la majorité d'entre elles reposent sur le principe de l'immunodosage. L'immunodosage est un test biochimique qui consiste à mesurer la concentration d'une espèce par l'usage d'un ou plusieurs anticorps immobilisés sur un support. Dans le cas des cytokines, l'utilisation d'anticorps permet d'assurer la haute sensibilité, spécificité et sélectivité requise pour l'analyse des cytokines.

Ce type de tests, *a priori* simple dans leur conception, nécessite néanmoins une fine optimisation de la nature et des concentrations des anticorps utilisés. De même, il faudra s'assurer de l'intégrité des anticorps immobilisés et de la stabilité des performances de détection pour permettre une quantification fiable des échantillons biologiques. Nous aborderons le principe de l'immunodosage et ces différents points de vigilance en détails dans la partie 2.5 de ce chapitre.

Les techniques de routine présentées ci-après dans le Tableau 1 - 2 reposent presque toutes sur des techniques immunologiques utilisant ainsi des anticorps comme élément de biorecognition (biorécepteur). Cependant, il existe aussi d'autres biorécepteurs permettant une détection spécifique et sensible des cytokines : les aptamères. Les revues de Stenken et Poschenrieder [38] et de Liu *et al* [65] offrent d'excellents exemples de différentes techniques de détection appliquées aux cytokines développées avant 2016.

Concernant les aptamères, ce sont des oligonucléotides synthétiques. Le plus souvent il s'agit de brin d'ARN ou d'ADN simple brin. Ils sont synthétisés à partir de banques combinatoires de séquences aléatoires de nucléotides. Ils sont capables de se lier avec une forte affinité et spécificité à de nombreuses molécules [66]. Leur synthèse est relativement facile et ils peuvent être modifiés à souhait en fonction de la cible souhaitée. Ils coûtent moins cher à produire que les anticorps car ils ne nécessitent pas d'animal/cellule hôte et sont entièrement produits par synthèse chimique. La possibilité de retrouver leur conformation initiale après dénaturation constitue un autre de leurs avantages. Par rapport aux anticorps, ils sont plus stables dans des conditions dénaturantes, ce qui en fait des candidats idéaux pour la conception de capteurs durables et recyclables. Ils peuvent même être conservés un certain temps sans système de refroidissement [67].

Généralement les détecteurs à base d'aptamères reposent sur les changements de leur conformation en temps réel lorsqu'ils sont exposés à leur cible. Par exemple, l'aptamère peut être modifié avec un marqueur fluorescent ou d'oxydo-réduction et son changement de conformation à la surface du capteur permettra une détection rapide du signal produit.

Parmi les travaux récents portant sur la détection de cytokines à partir d'aptamères, Tertis *et al* [68] ont développé un capteur impédancemétrique pour la détection de l'IL-6 à partir d'un aptamère modifié avec des nanoparticules d'or. Les aptamères modifiés avec les nanoparticules sont immobilisés sur une électrode en carbone vitreux à partir d'une couche auto-assemblée de p-aminothiophénol permettant la liaison avec la surface d'or (voir Figure 1 - 3A). Lors de la capture de l'IL-6 par l'aptamère, le changement de conformation modifie le signal détecté sur l'électrode par spectroscopie d'impédance par rapport à une surface contrôle sans IL-6. Ils ont ainsi pu atteindre une limite de détection de 1.6 pg/mL. Le capteur a été utilisé pour l'analyse d'échantillon sanguin de patients souffrant de cancer colorectal.

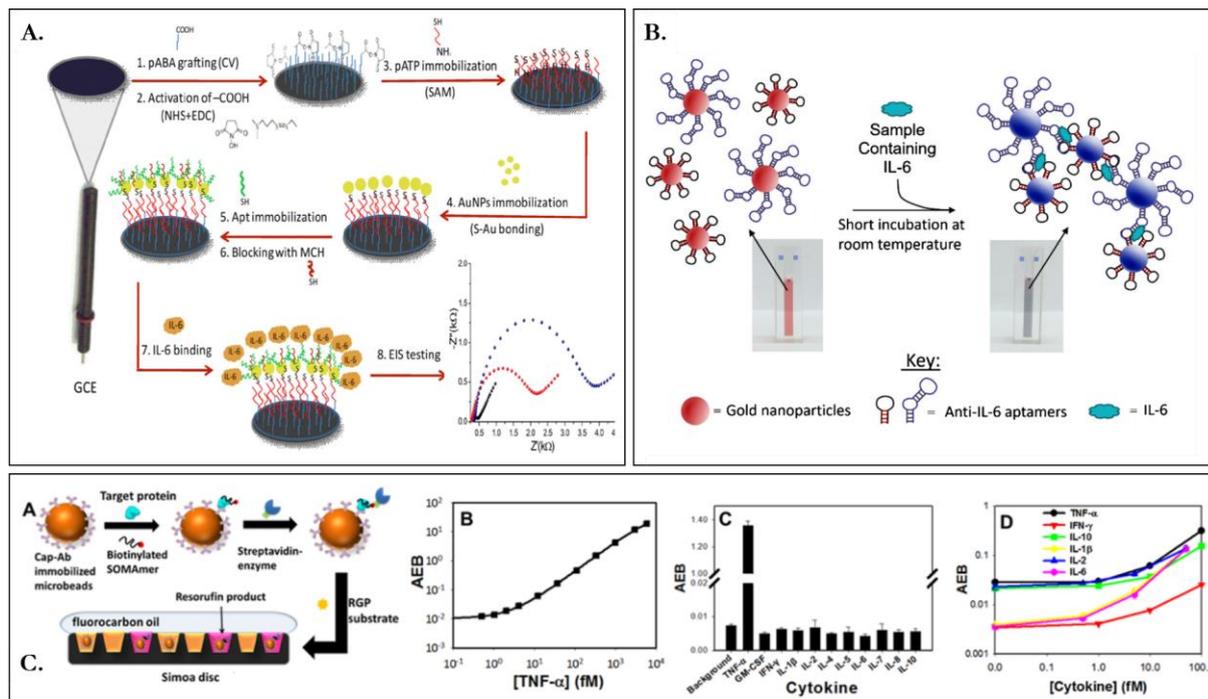


Figure 1 - 3. A. Principe du capteur impédancemétrique à base d'aptamère et de nanoparticules d'or développé par Tertis *et al* pour la détection de l'IL-6 dans le sang [68] ; **B.** Principe du capteur colorimétrique à base de paires complémentaires d'aptamères couplés à des nanoparticules d'or développé par Giorgi-Coll *et al* [69] ; **C.** Principe de la détection du TNF- α par le test Simoa hydride impliquant un SOMAmers comme espèce de détection du complexe bille-anticorps-TNF- α (adapté de [70])

Un autre capteur à base d'aptamère pour la détection de l'IL-6 a été récemment développé par Giorgi-Coll *et al* [69] sur un principe de détection colorimétrique. La détection se base sur l'agrégation de nanoparticules d'or greffées avec deux structures « sandwich » (voir partie 2.5.1) complémentaires d'aptamères orientés vers l'IL-6. Lors de la reconnaissance de la cible par l'aptamère, la paire d'aptamères complémentaires se lie à la structure et une agrégation des nanoparticules a lieu. Cette agrégation engendre une modification de la couleur de la solution de nanoparticules en suspension du rouge vers le rose. Le changement d'absorption peut alors être mesuré par un spectrophotomètre (voir Figure 1 - 3B). La limite de détection atteinte est de 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ce qui reste trop élevé pour être appliqué à des échantillons biologiques et s'explique par le manque de sensibilité de la détection colorimétrique. Néanmoins, la facilité de conception du capteur pourra peut-être permettre le développement d'un capteur portable bon marché.

Un dernier exemple de l'utilisation des aptamères comme alternatives aux anticorps est présenté par Wu *et al* [70]. Ils ont transposé le test Simoa (*Single Molecule Array*) [71], traditionnellement utilisé avec des anticorps, à une classe d'aptamères appelés SOMAmers pour *Slow off-rate modified aptamers*. Ces aptamères contiennent des nucléotides modifiés avec des fonctionnalités chimiques particulières leur permettant d'imiter les chaînes latérales des acides aminés. Ils peuvent ainsi établir des interactions avec une affinité proche de celle des anticorps vis-à-vis de leur cible biologique. Le test Simoa dans lequel ils ont été intégrés repose sur un principe similaire à l'ELISA (voir Tableau 1 - 2) mais avec des billes magnétiques comme support d'immobilisation. Chaque bille est ensuite isolée dans des micropuits ; ce qui permet une détection fluorescente très sensible. Ici, les billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps anti-TNF-

α capturent le TNF- α . Puis le complexe est détecté par des SOMAmers biotinylés spécifiques du TNF- α . La détection sera réalisée après interaction de la biotine avec une streptavidine couplée à une enzyme (β galactosidase) permettant une détection fluorescente (voir Figure 1 - 3C). L'analyse avec le dispositif Simoa a alors permis d'atteindre une limite de détection de 12 fg/mL. Une sensibilité comparable avait été obtenue pour le même protocole réalisé avec des anticorps mais les résultats présentaient d'importantes variations lorsque le test était répété avec les mêmes anticorps issus d'autres lots. L'utilisation des aptamères pour la détection permet d'améliorer considérablement la reproductibilité du test ; ce qui est indispensable en milieu clinique. Il reste néanmoins à démontrer que l'anticorps de capture peut également être remplacé par un aptamère pour transformer ce test en un capteur entièrement aptamérique.

Bien que ces différentes applications montrent les multiples avantages conférés par les aptamères dans la détection des cytokines, il existe encore très peu d'aptamères développés pour une variété de cibles (et encore moins pour les cytokines). La variété d'anticorps disponibles commercialement est bien plus importante pour ce type d'application. De plus, la mise au point de tests de détection à base d'un aptamère donné nécessite des conditions optimisées qui ne sont pas facilement transposables à d'autres aptamères [66]. Les anticorps en revanche bénéficient de protocoles standardisés qui facilitent leur utilisation et leur transposition à plusieurs tests. Par conséquent, à ce jour les anticorps restent les biorécepteurs les plus adaptés pour le développement de méthodes de détection et de quantification des cytokines. Le Tableau 1 - 2 ci-dessous présente les différentes techniques les plus utilisées en laboratoire et se basant sur une détection immunologique des cytokines.

L'ensemble de ces techniques résident au cœur de kits de détection commerciaux proposés par différents fabricants comme Invitrogen, MSD, Becton Dickinson, Bio-Rad, Millipore, BioSource, ... [38,65] . En revanche, bien que des performances de détection remarquables puissent être atteinte ($<pg/mL$), et notamment des analyses multiplexes pour certains systèmes, la plupart souffre de longs temps de préparation et d'incubation, de nombreuses étapes de rinçage, de manque de reproductibilité, de volume d'échantillon requis important, ... Un ensemble de problèmes que la miniaturisation des dispositifs et le développement de nanotechnologies tentent ainsi de résoudre.

Tableau 1 - 2. Présentation générale des techniques de laboratoires pour l'immunodosage des cytokines

Techniques	Principe	Avantages	Inconvénients	Sensibilité	Références
ELISA (enzymatique et radioisotopique)	Un anticorps immobilisé sur une surface permet la capture de la cytokine et un second anticorps conjugué à une enzyme ou un radioisotope permet sa détection	Très couramment utilisé Bonne sensibilité	Ne permet pas de quantifier plusieurs cytokines en même temps (multiplexage) Long (plusieurs heures) Volume d'échantillon généralement important (~100µL)	~pg/mL	[72-74]
ELISPOT	Même principe que l'ELISA mais appliqué à des populations de cellules sécrétant l'antigène donné	Permet de détecter les cytokines produites par des cellules individuelles Permet un tri rapide des cellules	Ne s'applique qu'aux petites populations de cellules en suspension Long (plusieurs heures) Semi-quantitatif	NA (s'exprime en nombre de spot)	[75,76]
FluoroSpot	Similaire à l'ELISPOT mais utilise un fluorophore plutôt qu'une enzyme liée à l'anticorps de détection	Peut détecter plusieurs cytokines à la fois à l'aide de différents fluorophores	Autofluorescence Photoblanchiment Long (plusieurs heures) Semi-quantitatif	NA (s'exprime en nombre de spot)	[77]
Microréseau d'anticorps	Dépôts structurés d'anticorps sur une surface (verre, membrane) par des techniques de lithographies pour réaliser un immunodosage localisé	Multiplexage Très utilisé pour le screening d'échantillons avec de nombreuses cytokines différentes	Autofluorescence Photoblanchiment Long (plusieurs heures) Réactivité croisée	~pg/mL	[78-81]
Cytométrie en flux	Des cellules sont marquées avec des fluorophores pour permettre la détection des populations de cellules exprimant des cytokines	Rapide	Autofluorescence Photoblanchiment Instrumentation coûteuse et volumineuse Semi-quantitatif	NA	[82]
Cytométrie sur billes	Microbilles contenant des fluorophores servent de support solide pour l'immunodosage. Détection de la fluorescence de la bille et des anticorps immobilisés sur une plateforme de cytométrie	Rapide Faible volume d'échantillon nécessaire (~µL) Multiplexage Réaction rapide Haute spécificité	Autofluorescence Photoblanchiment Nécessite une plateforme de cytométrie	~pg/mL	[83]

		Bonne reproductibilité			
Test à flux latéral	L'échantillon est déposé sur une bande de nitrocellulose et migre par force capillaire le long de la bande. Des anticorps généralement conjugués à des nanoparticules d'or ou des sphères de latex fluorescentes ou colorées sont déposés le long de la bande pour permettre leur identification après capture de l'antigène. D'autres bandes de réactifs sont répartis sur le support pour permettre l'immunodosage complet.	Rapide Facile à développer Peu cher	Semi-quantitatif Sensibilité limitée par le volume d'échantillon	~pg/mL	[84,85]
Electrophorèse capillaire	Les anticorps de capture sont immobilisés dans un capillaire de silice, les cytokines sont marquées par un fluorophore, capturées et relarguées par un lavage acide. La séparation/détection est ensuite faite par EC-LIF	Rapide Faible volume d'échantillon Multiplexage	Instrumentation coûteuse et volumineuse (mais miniaturisation sur puce possible)	~pg/mL	[86]
Mesure électrochimiluminescente	L'anticorps de détection est modifié avec un marqueur chimiluminescent et la réaction de détection implique un processus électrochimique suivi par ampérométrie	Haute sensibilité Peu cher à fabriquer	Multiplexage limité par le manque de marqueurs différents existants	<pg/mL	[87,88]

1.3.3. Intérêt de la miniaturisation et de l'utilisation de biocapteurs portables

Les instruments et techniques présentés précédemment pour la détection et la quantification des cytokines ont certes l'avantage d'offrir des analyses robustes et sensibles mais requièrent souvent du matériel coûteux, parfois volumineux, ainsi que du personnel formé à son utilisation. Les échantillons analysés reposent généralement sur une collecte invasive et parfois lourde pour le patient, des volumes importants d'échantillons ainsi que différentes étapes de prétraitement pour correspondre aux critères d'analyse de la méthode (concentration, purification, solvant, ...).

Aussi, la miniaturisation des outils d'analyse offre un avantage considérable en rassemblant au même endroit les différentes étapes de collecte, traitement et analyse. En particulier, la microfluidique représente un atout majeur pour la conception de systèmes d'analyse miniaturisés (voir Figure 1 - 4). Au fur et à mesure des années, elle s'est imposée comme un domaine de recherche aux applications prometteuses, mêlant des disciplines variées allant de la physique appliquée à la chimie de surface, en passant par la chimie analytique et la biochimie. Aujourd'hui de nombreuses applications ont réussi à franchir le pas de l'industrialisation et de la commercialisation : le diagnostic (test de grossesse, glycémie), la biodétection, l'impression ...

La principale force de la microfluidique réside dans la manipulation de volume de l'ordre du μL dans des dispositifs de taille minimale, favorisant un rapport surface/volume important, accélérant les échanges thermiques et les réactions chimiques. De plus, l'échelle d'interaction des différents composants d'une puce microfluidique varie de quelques nanomètres à quelques millimètres. Ainsi, la taille du dispositif et des éléments qui le composent avoisine la taille des éléments biologiques et chimiques à manipuler (de la molécule à la cellule), créant des conditions favorables pour l'étude des réactions et interactions entre ces différents éléments et leur environnement.

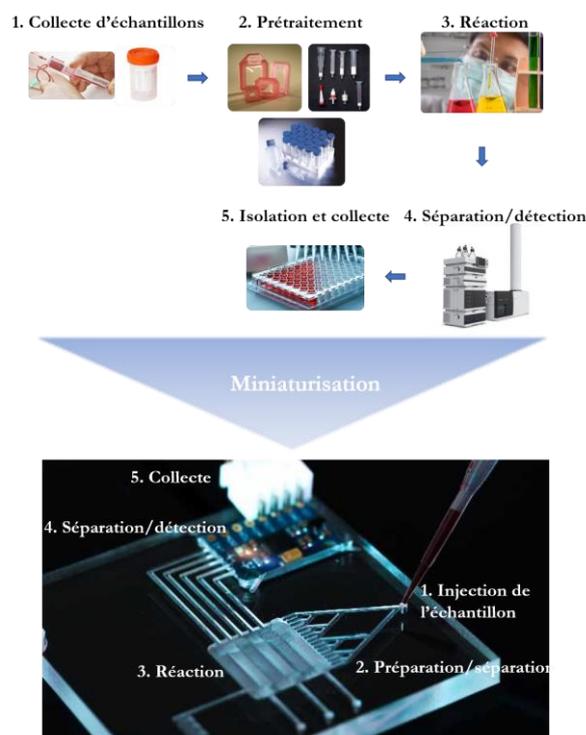


Figure 1 - 4. Illustration du processus de miniaturisation des analyses standards de biochimie vers des analyses microfluidiques sur puce

La microfluidique s'avère plus particulièrement prometteuse dans le domaine de l'analyse biologique avec l'arrivée des laboratoires sur puce (*Lab-on-a-Chip* ou *micro Total Analysis System*). Ces dispositifs capables de réaliser des opérations de laboratoires plus ou moins complexes ont surtout permis de réduire les temps d'analyse, de limiter la consommation de réactifs et d'échantillons biologiques ainsi que de diminuer drastiquement la taille des appareils utilisés et le personnel nécessaire, permettant des mesures « de terrain ». Ces critères sont particulièrement importants dans le cas des cytokines afin de permettre un suivi rapide et fiable des patients au niveau clinique en vue de déterminer efficacement le parcours de traitement à suivre [38].

Dans le cas des biocapteurs de la sueur, leur taille, leur design et leur application directement à proximité de la peau en font des candidats prometteurs comme alternatives aux instruments analytiques traditionnellement utilisés dans le secteur de la santé [56,89]. Par ailleurs, leur portabilité et leur caractère non invasif permettent une utilisation aisée car le dispositif peut être installé et retiré sans recourir à un professionnel de santé ou à un équipement particulier [90]. L'essor des technologies de miniaturisation ainsi que le développement de nouveaux matériaux ont permis de rapprocher ce type de dispositif au plus près de la peau et de leur associer des avantages notables comme la portabilité, le faible encombrement, la possibilité de transmettre des données à distance, la conformabilité avec la peau et la résistance aux contraintes imposées par les mouvements du corps humain. Néanmoins, la plupart des dispositifs développés restent encore des prototypes. Ils nécessitent par ailleurs de répondre aux différents critères imposés par le secteur biomédical, à savoir la possibilité de suivre l'état d'un individu en temps réel en recueillant un maximum d'informations physiologiques fiables sans troubler le confort du patient, et sur un intervalle de temps suffisamment long en complète autonomie. Le dispositif doit également répondre à des critères de coût, de biocompatibilité et de recyclabilité.

Pour autant, l'avenir des biocapteurs de la sueur est prometteur, garantissant un impact sans précédent pour la médecine et le suivi personnalisé des pathologies. Les nombreux défis relevés et restant à relever offrent aujourd'hui l'opportunité à de nombreuses disciplines de collaborer. Par ailleurs, la grande variété de biomarqueurs existant dans les différents fluides biologiques disponibles (salive, larme, sueur, urine, fluide interstitiel, etc.) offre également des perspectives pour le suivi de nombreuses pathologies. [91]

Dans le cas des cytokines, les biocapteurs ont à ce jour été assez peu appliqués à leur analyse. Nous allons voir dans la partie suivante les différents éléments constitutifs d'un biocapteur puis nous détaillerons la conception de ces différents éléments dans le but de la fabrication d'un biocapteur microfluidique flexible appliqué à la détection des cytokines.

2. Biocapteurs appliqués à la détection des cytokines

La première étape pour la conception d'un biocapteur consiste à définir le type de détection utilisée afin d'atteindre la sensibilité requise pour la cible visée. Nous verrons que plusieurs méthodes de détection existent, avec des avantages et contraintes variables. Puis, l'étape suivante consiste à choisir le matériau avec les propriétés correspondant à l'usage souhaité et la méthode de détection sélectionnée. Les propriétés concernées peuvent être mécaniques (élasticité, flexibilité, robustesse, viscosité), optiques (opacité, autofluorescence, diffusion, absorption, photosensibilité), biochimiques (biocompatibilité, recyclabilité), chimiques (compatibilité avec des acides, bases ou solvants), électriques (résistivité, conductibilité), ... Ensuite, le matériau choisi étant le plus souvent

inerte, il devra être fonctionnalisé afin d'y attacher un biorécepteur capable de reconnaître de manière sensible et spécifique la cible visée. Enfin, le choix du composant biosensible influencera la méthode de bioconjugaison avec la surface fonctionnalisée et déterminera en grande partie les performances de détection du biocapteur (stabilité, sensibilité, spécificité).

Ainsi, dans cette partie, nous allons d'abord présenter les différents composants d'un biocapteur ainsi que les critères de performance de leurs analyses. Puis nous détaillerons les différents systèmes de détection (transduction) et plus particulièrement le cas de la fluorescence figurant au cœur de cette thèse. Ensuite, nous aborderons l'intégration microfluidique de ces composants et notamment le choix de matériaux flexibles pour la conception d'un biocapteur de type patch. Nous présenterons également les techniques de fonctionnalisation de ces matériaux pour la conception de la surface biosensible. Enfin, nous terminerons par les méthodes de conjugaison de la surface avec les anticorps en vue de l'immunodosage des cytokines.

2.1. Généralités sur les biocapteurs

Un biocapteur se définit comme « un dispositif utilisé pour la détection de bioanalyte consistant en un composant de reconnaissance biologique, interagissant ou réagissant avec le bioanalyte étudié, et un transducteur qui convertit cette composante de reconnaissance en un signal de sortie électrique mesurable. » [92]

La Figure 1 - 5 regroupe les différents composants d'un biocapteur et les interactions entre ces composants. Ainsi, un biocapteur est composé de :

- un biorécepteur : il s'agit d'un élément biologique (ou dérivé) plus ou moins complexe capable de reconnaître spécifiquement un analyte. Il peut s'agir d'une enzyme, d'une cellule, d'un anticorps, de brin d'ADN ou encore d'aptamères. La reconnaissance de l'analyte par le biorécepteur produit un signal sous forme de transfert de charge, de changement de masse, de chaleur ou de lumière.
- un transducteur : il s'agit d'un élément capable de convertir un type d'énergie issue de l'étape de biorecognition en un autre type d'énergie pour fournir un signal mesurable. Le signal de sortie sera généralement de nature optique ou électrique.
- l'électronique : il s'agit de la partie du biocapteur capable de traiter le signal du transducteur pour le convertir en résultats affichables. Le signal peut être filtré, amplifié, digitalisé et quantifié, transmis à distance à un autre appareil...
- l'affichage : il s'agit de l'élément de lecture et d'interprétation des résultats. Il peut s'agir d'un écran intégré, d'un affichage lumineux, d'un appareil annexe ayant reçu les résultats (smartphone, tablette, ordinateur...)

Le choix et la bonne intégration de ces différents composants doivent permettre au biocapteur de répondre à plusieurs critères d'efficacité :

- sélectivité : il s'agit de la capacité du biocapteur à détecter un analyte spécifique dans un échantillon contenant d'autres éléments biologiques. Les anticorps restent des systèmes de détection de choix afin de garantir une forte spécificité par la nature de la liaison antigène-anticorps.
- spécificité : il s'agit de la capacité du biocapteur à détecter exclusivement un analyte donné avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyte et non pas d'une interférence.

- reproductibilité : il s'agit de la capacité du biocapteur à fournir des réponses identiques pour des conditions d'analyse identique en terme de précision et de justesse des résultats
- stabilité : il s'agit de la sensibilité du biocapteur aux perturbations ambiantes (température, pression, contrainte mécanique). Certains biocapteurs intègrent des éléments de mesures afin de corriger la variation du signal dépendamment des conditions extérieures [59].
- sensibilité : il s'agit de la limite de détection du biocapteur. Généralement, dans les différentes applications possibles, un biocapteur doit être capable de détecter un analyte dans des concentrations allant de quelques fg/mL à quelques µg/mL.
- résolution : il s'agit de la variation minimale requise en concentration de l'analyte pour occasionner une modification du signal du biocapteur. Une loi de proportionnalité s'applique généralement entre la sensibilité du biocapteur, la concentration de l'analyte et le signal de sortie. Par ailleurs, cette linéarité doit être assurée sur une gamme de concentrations suffisamment grande pour être applicable dans le milieu souhaité.

Dans le cas des biocapteurs appliqués à la peau ou « épidermiques », des critères plus spécifiques s'ajoutent aux précédents : résistance mécanique et thermique, flexibilité, étanchéité, robustesse, alimentation en énergie et communication sans fil, encombrement et système de collecte de la sueur, stabilité face aux contraintes de l'environnement (perturbations thermique, mécanique, chimique, électromagnétique), rapidité du temps de réponse pour permettre un suivi en temps réel, tolérance cutanée [93–95].

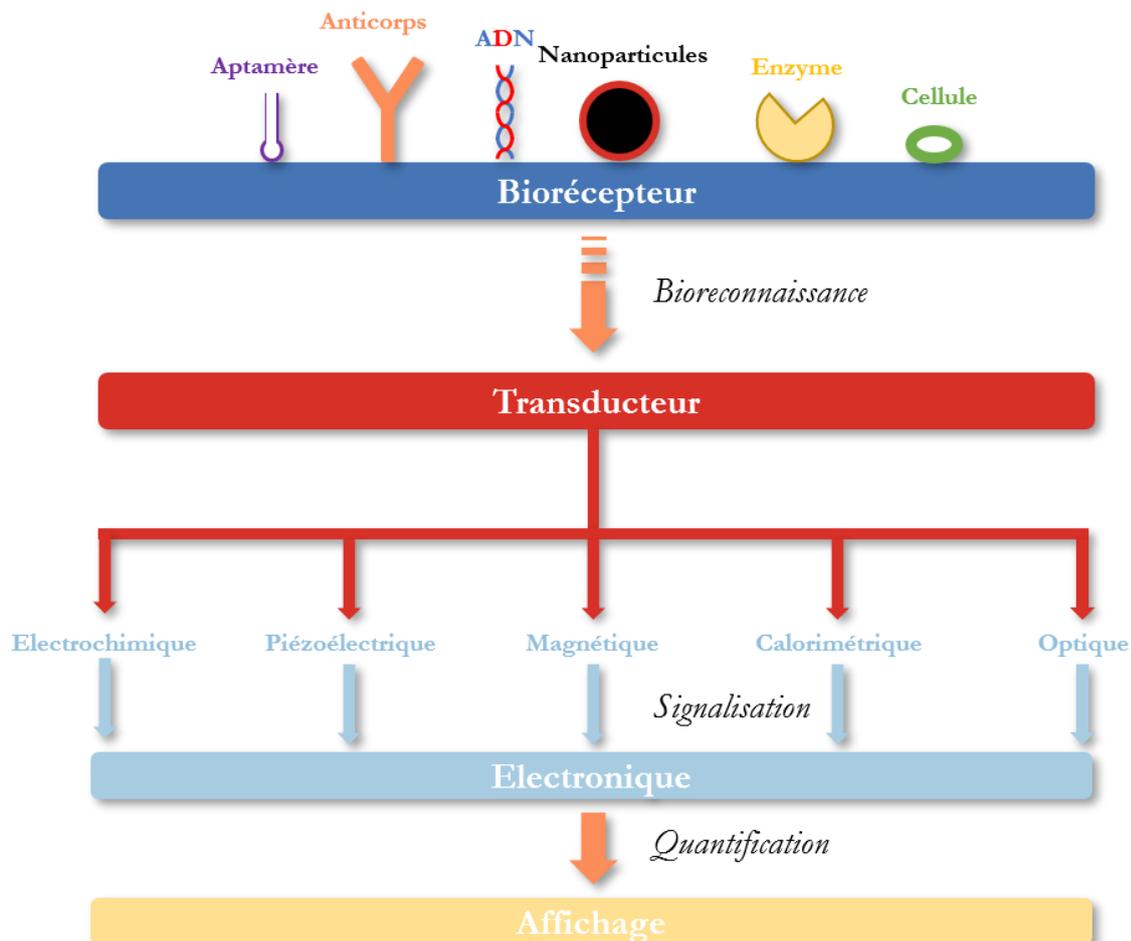


Figure 1 - 5. Les différents composants d'un biocapteur et leurs interactions

Les critères de sélectivité, sensibilité, résolution, reproductibilité et temps de réponse sont directement dépendants de la technologie de détection utilisée (transducteur), dont certaines ont été abordées dans la partie 1.3.3. Les technologies les plus utilisées actuellement pour les biocapteurs épidermiques restent les capteurs électrochimiques et optiques de par leur sensibilité et facilité de conception et miniaturisation [95,96].

Nous allons dans la partie suivante nous intéresser plus particulièrement aux transducteurs optiques à fluorescence qui figurent au cœur du dispositif visé dans cette thèse. Nous nous limiterons également à leur utilisation pour la détection de cytokines dans la mesure du possible.

2.2. Transducteurs appliqués à l'immunodétection des cytokines

2.2.1. Détection en fluorescence

Les biocapteurs basés sur une détection fluorescente reposent sur l'interaction d'une molécule fluorescente (fluorophore) avec un faisceau lumineux incident. Généralement, la quantification se basera sur l'intensité du signal fluorescent produit dans le spectre visible ou proche UV. L'avantage de ce genre de capteur repose sur leur facilité d'élaboration, leur faible coût et leur capacité à fonctionner sans source électrique externe (contrairement à certains capteurs électrochimiques par exemple). Ils sont donc faciles à intégrer dans un dispositif miniaturisé et portable [95]. Par ailleurs, ils offrent une grande flexibilité dans la variété d'appareil de mesure utilisable pour la quantification du signal fluorescent : microscope fluorescent, spectrophotomètre, lecteur de microplaque, scanner de biopuces, appareil de cytométrie en flux, ...

En comparaison des tests colorimétriques, la fluorescence permet aussi une meilleure sensibilité et un multiplexage aisé des analyses grâce à la variété de fluorophores disponibles. Cependant, cette sensibilité peut se montrer insuffisante pour l'analyse de biomarqueurs en très faible concentration comme les cytokines. Aussi, différentes stratégies visant soit à modifier les marqueurs fluorescents en se basant notamment sur des nanomatériaux, soit à modifier les méthodes de détection, ont été développées au fil des années avec pour objectif d'atteindre des limites de détection inférieure au pg/mL [97].

➤ Augmentation du signal de fluorescence

L'utilisation de micro et nanoobjets est ainsi une stratégie très largement développée aujourd'hui afin d'améliorer la qualité de la détection [98]. En effet, par leur taille et leur géométrie, les micro et nanoobjets offrent une très grande surface spécifique ; ce qui en fait des supports de choix pour l'immobilisation d'anticorps mais aussi pour la manipulation des molécules. Les réactions sont optimisées et plus rapides, les volumes d'échantillons nécessaires sont également plus faibles ($\sim \mu\text{L}$) [81,99]. Les nanoparticules et billes fluorescents/magnétiques se sont rapidement imposées dans les tests de détection, comme pour les tests commerciaux de type Luminex [100,101]. Des microbilles (5 à 7 μm) contenant des fluorophores servent de support solide pour l'immunodosage et sont ensuite triées et analysées par un laser permettant de détecter le signal issu des billes ainsi que celui de l'anticorps de détection fluorescent sur un appareillage similaire à la cytométrie en flux. La grande variété de billes et de fluorophores associés permet d'analyser plusieurs cytokines en parallèle.

Par ailleurs, Blicharz *et al* [102] ont réalisé une analyse multiplexe de 10 cytokines différentes dans des échantillons de salive de patients souffrant de maladies pulmonaires à partir de microbilles fluorescentes avec une limite de détection de l'ordre du pM. Zhang *et al* [103] ont pu atteindre une

limite de détection de 0.1 pg/mL pour l'IL-6 à partir d'un volume d'échantillon de 1 µL. L'immunodosage de la cytokine est réalisé à la surface d'une fibre optique fonctionnalisée avec des anticorps. La détection fluorescente est assurée par un anticorps couplé à une nanoparticule magnétique fluorescente. La réponse fluorescente est ici améliorée car elle est intrinsèque à la bille ; ce qui améliore l'intensité et la distribution localisée du signal fluorescent.

Les quantum dots constituent également une alternative aux fluorophores traditionnels. Ce sont des nanoparticules semiconductrices réalisées à partir de matériaux inorganiques avec une structure cœur-coquille (CdS/ZnS, CdSe/ZnS, InAs/CdSe, ...). Ces nanoparticules sont généralement hydrophobes et nécessitent d'être recouvertes d'une couche hydrophile afin de les utiliser en milieu aqueux. Leur intérêt réside dans leur performance optique : les quantum dots possèdent une large bande d'excitation et de très fins pics d'émission ; ce qui facilite grandement leur utilisation et limite les phénomènes d'autofluorescence. Par ailleurs, leur rendement quantique (nombre de photons émis/nombre de photons absorbés) est très élevé et ils ne subissent pas de photoblanchiment. Ce sont donc des marqueurs fluorescents bien plus stables et durables que les fluorophores couramment utilisés. Ainsi, Borse *et al* [104] ont développé un test d'immunodosage à flux latéral de la protéine CRP et de l'IL-6 à partir de quantum dots CdTe. La bande de nitrocellulose servant comme support est ensuite analysée dans un analyseur à fluorescence portable. Ils ont ainsi pu atteindre des limites de détection de 0.3 µg/mL et 0.9 pg/mL pour la protéine CRP et l'IL-6 respectivement.

De même, l'utilisation de marqueurs bioluminescents plutôt que fluorescents dans les immunodosages permet d'éviter les problèmes d'auto-fluorescence du substrat car le signal lumineux est produit par une réaction avec une photoprotéine, sans excitation lumineuse extérieure. La sensibilité de la détection est donc améliorée. En revanche, le multiplexage reste limité par le choix de photoprotéines encore restreint. Cependant, Yu *et al* [105] ont réalisé un immuno-essai multiplexe du TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 par compétition en modifiant les propriétés d'émission et de cinétique d'excitation de l'aequorine (AEQ), une photoprotéine. Ils ont ainsi comparé leur analyse à 3 tests ELISA correspondant aux 3 cytokines et ont démontré des performances similaires avec un temps d'analyse et de volume de réactif considérablement réduits. De même, Moutsopoulos *et al* [106] ont développé un immunodosage bioluminescent pour l'interféron γ (IFN- γ) basé sur un marquage des anticorps de détection avec la *Gussia* luciférase. Ils ont ainsi pu atteindre des limites de détection de l'ordre du pM.

➤ Amélioration des méthodes de détection

Une autre stratégie consiste à améliorer le système de détection ou les réactions de détection plutôt que de changer les marqueurs fluorescents.

Une première technique utilisée pour augmenter la réponse fluorescente des fluorophores repose sur l'exaltation de fluorescence par structure métallique (*Metal Enhanced Fluorescence*). Ce principe repose sur l'exaltation de l'excitation des fluorophores placés à proximité d'une surface métallique par concentration d'un champ électromagnétique au sein de la structure. Par ailleurs, lorsque le métal est positionné à une distance optimale du fluorophore, les processus de désexcitation du fluorophore sont modifiés ; ce qui augmente la quantité de photons émis dans le temps. Cette approche nécessite néanmoins une fine optimisation de la distance métal-fluorophore afin de maximiser les échanges électromagnétiques et électroniques entre les deux éléments.

L'utilisation de nanoparticules facilite notamment cette optimisation et permet la formation de plasmons de surface localisés sur la nanoparticule. Un plasmon est une oscillation collective des électrons libres dans le métal. Ces derniers amplifient le champ électromagnétique à la surface de la particule et donc à proximité du fluorophore. Une distance optimale de 5 à 20 nm entre la surface et le fluorophore a été établie pour des particules d'or [107]. Appliquée à la détection en fluorescence de cytokines, cette méthode a permis à Zhang *et al* [108] de réaliser une analyse multiplexe de plusieurs cytokines à l'aide de nanoparticules d'or *via* un protocole d'immunodosage en sandwich avec un fluorophore Cy5. Une limite de détection de 0.2 pg/mL a été obtenue avec des performances surpassant largement celles de billes de verre préparées dans les mêmes conditions (voir Figure 1 - 6).

De même, Valentina *et al* [109] ont réalisé un test en microréseau d'anticorps sur une puce plasmonique à base d'or pour la quantification d'IL-20 en utilisant un immuno-sandwich avec un anticorps de détection biotinylé à un fluorophore IRDye-800 (LiCor Biosciences). Ils ont ainsi réduit la limite de détection à 1 pg/mL avec une plage dynamique de 5 ordres de grandeur et un volume d'échantillon de 5 μ L à partir de sérum humain et de liquide synovial de patients atteint de polyarthrite rhumatoïde. Par ailleurs, Toma *et al* [110] ont réalisé un capteur à base de verre recouvert d'une fine couche d'or. Ce substrat est ensuite recouvert de polydopamine, un polymère biomimétique, permettant l'immobilisation des anticorps sur la surface du capteur. L'immunodosage de l'IL-6 a alors été réalisé avec une structure sandwich avec un anticorps de détection marqué à l'Alexa Fluor 647 (ThermoFischer). Les étapes de greffage ont été suivies par des mesures SPR classiques et la quantification de l'IL-6 a été réalisée en fluorescence pour atteindre une limite de détection de 2 pg/mL.

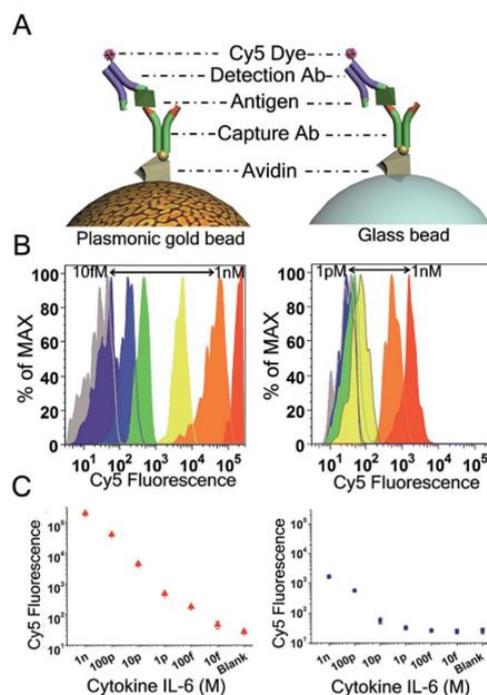


Figure 1 - 6. Quantification de l'IL-6 sur des billes d'or par exaltation plasmonique de la fluorescence. **A.** Immunodosage en sandwich réalisé sur les billes d'or et de verre. **B.** Courbes de cytométrie obtenues pour la calibration du dosage de l'IL-6 sur des billes d'or (gauche) et de verre (droite) de 8 microns. **C.** Quantification en fluorescence de l'IL-6 sur les billes d'or plasmonique (gauche) et de verre (droite) (adapté de [108])

Une autre stratégie d'amélioration de la détection fluorescente consiste en l'utilisation de la microfluidique avec des billes comme supports d'immobilisation permettant également de faciliter les interactions entre réactifs dans un espace confiné et donc d'augmenter la sensibilité de l'immunodosage tout en réduisant les temps de réaction. L'exploitation de la microfluidique peut permettre de faciliter le mélange des réactifs et des espèces pour optimiser les étapes de greffage et détection. Ainsi, Cohen *et al* [111] ont réalisé une puce microfluidique intégrant un design permettant d'atteindre des régimes turbulents pour optimiser le mélange de billes protéine G sur lesquelles est réalisé l'immunodosage en sandwich. Ils ont ainsi pu réduire drastiquement le temps de diffusion des espèces, éviter les étapes de rinçage et minimiser la quantité d'échantillon nécessaire. Une détection presque en temps réel de TNF- α a ainsi pu être réalisée avec une limite de détection de 20 pg/mL.

Ainsi, la quantification des cytokines par immunodosage par détection par fluorescence peut utiliser de nombreuses stratégies différentes permettant d'atteindre les seuils de détection requis pour la détection en milieu biologique. La flexibilité de la conception des capteurs à fluorescence en fait une technique de choix pour la transduction de la détection des cytokines. Par ailleurs, l'utilisation de micro/nano objets conjugués à la microfluidique semble être une stratégie particulièrement compatible avec la conception de biocapteurs. Le dispositif visé dans cette thèse s'inscrit ainsi entièrement dans cette optique. Il existe néanmoins de nombreuses autres méthodes de détection (transduction) qui permettent d'atteindre des performances remarquables, notamment pour la détection des cytokines. La partie suivante s'attachera donc à en présenter quelques exemples.

2.2.2. Autres types de transducteurs

Au-delà de la détection par fluorescence, de nombreuses autres modalités de détection ont été développées pour la fabrication de biocapteurs. Plusieurs d'entre elles ont notamment été appliquées à la détection de cytokines, exigeant une extrême sensibilité. Nous détaillerons ici quelques exemples notables de biocapteurs alternatifs aux biocapteurs fluorescents.

➤ La détection électrochimique

La détection électrochimique est un des modes de détection les plus utilisés pour les biocapteurs. Ce type de capteur utilise une électrode comme transducteur. Celle-ci mesure le courant produit par une réaction d'oxydo-réduction en lien avec la concentration des espèces électroactives, indiquant leur formation ou consommation. Beaucoup de développement ont porté sur ce type de capteur du fait de leurs performances (rapide et sensible), leur portabilité, leur simplicité de conception et leur faible coût, en particulier pour des applications cliniques [112,113]. Plusieurs types de biocapteurs électrochimiques existent dépendamment du type de réaction mis en jeu : ampérométrique, potentiométrique, impédance-métrique et conductimétrique. Pour plus de détails sur le fonctionnement de ce type de capteur, le lecteur est invité à lire la revue de Bhandodkar *et al* [95]. De même, les travaux de Piro et Reisberg [114] offrent une vision globale des avancées dans la conception d'immunocapteurs électrochimiques. Enfin, la revue de Filik et Avan [115] aborde le cas spécifique de l'immunodétection électrochimique du TNF- α .

Ainsi l'équipe de Baraket [44] a développé un biocapteur électrochimique pour la détection du TNF- α dans de la salive par spectroscopie d'impédance avec une limite de détection de 1 pg/mL.

Les anticorps anti-TNF- α ont été immobilisés sur 8 électrodes de travail en or intégré à une plateforme contenant une contre électrode de platine et une électrode de référence Ag/AgCl. La plateforme a été microfabriquée en salle blanche et montée sur un circuit imprimé (PCB). La quantification est alors basée sur la mesure du transfert de charge d'une solution de $\text{FeCN}_6^{3-}/\text{FeCN}_6^{4-}$ au contact de l'électrode en fonction de la présence ou non de l'antigène. Le même dispositif a également permis de détecter les interleukines IL-1b et IL-10 avec des limites de détection de 1 pg/mL [116]. Yang *et al* ont adopté le même type de mesure sur des nanoparticules d'or immobilisées sur des nanotubes de carbone pour l'immunodosage de l'IL-6 [117].

Yin *et al* [118] ont utilisé la voltampérométrie différentielle pulsée pour quantifier le TNF- α en solution avec une limite de détection de 10 pg/mL. Pour cela, des nanosphères de poly(styrène-acide acrylique) ont servi de support d'immobilisation pour des nanoparticules d'or afin de conjuguer de l'alkaline phosphatase (ALP). Ces nanosphères sont ensuite biofonctionnalisées par des anticorps dirigés contre le TNF- α . Celles-ci sont ensuite utilisées pour réaliser un immunodosage de type sandwich du TNF- α à l'aide d'anticorps immobilisés sur une électrode carbone-verre recouverte de polyaniline formant un complexe (électrode/anticorps/TNF- α /anticorps/nanosphères-ALP). L'ALP va permettre la digestion enzymatique d' α -naphthyl phosphate (p-NPP) conduisant à la formation d' α -naphthol (p-NP), une substance électro-active. La quantité de TNF- α sera proportionnelle à l'intensité du signal électrochimique de p-NP (voir Figure 1 - 7).

Arya *et al* [119] ont également développé un capteur électrochimique basé sur l'utilisation de l'ALP comme marqueur enzymatique conjugué aux anticorps de détection pour la quantification du TNF- α dans du sérum avec une limite de détection de 60 pg/mL.

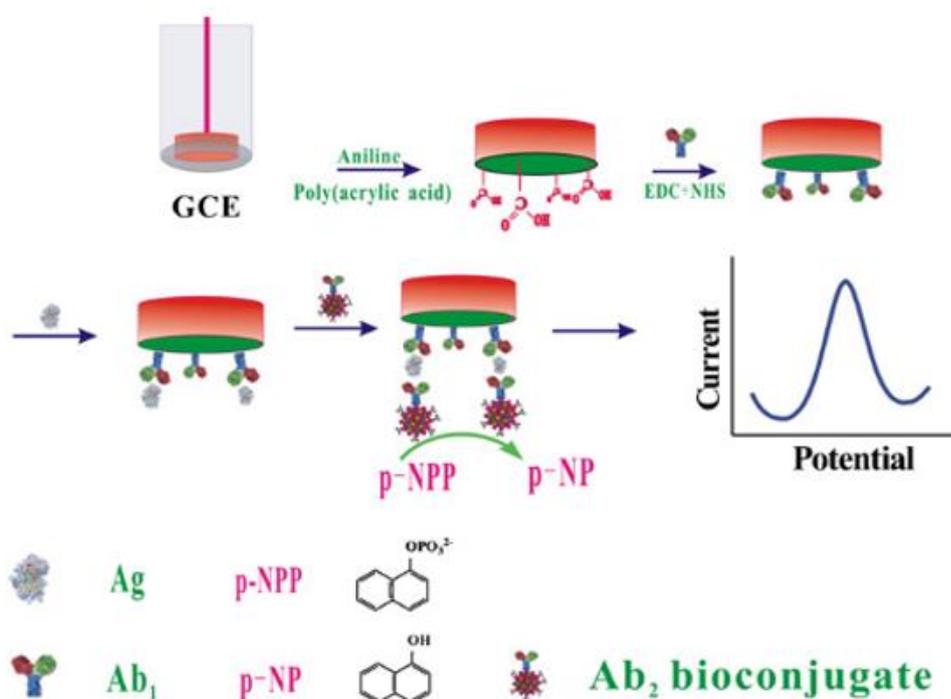


Figure 1 - 7. Représentation schématique de l'immunocapteur voltampérométrique à base de nanosphères PSA-nanoparticules d'or-ALP-anticorps (adapté de [118])

Jiang *et al* [120] ont aussi proposé une approche enzymatique pour la détection du TNF- α dans le sang avec un revêtement limitant l'adsorption non-spécifique à la surface de l'électrode. Pour cela, ils ont utilisé une couche hybride de phenyl phosphorylcholine (PPC) et phenyl butyric acid (PBA). La détection repose sur un immunodosage de type sandwich avec des anticorps de capture immobilisés à la surface d'une électrode d'ITO (indium tin oxyde) et des anticorps de détection couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase). A l'ajout d'une solution de H₂O₂, une réaction d'oxydo-réduction se produit, suivie par spectroscopie d'impédance. Une limite de détection de 10 pg/mL a ainsi pu être atteinte.

Les immunocapteurs électrochimiques reposent donc sur une grande variété de modalités de détection. Les performances de détection atteignables les rendent particulièrement intéressants pour la détection des cytokines. Cependant, ils reposent tous sur un appareillage de mesure permettant l'acquisition et une alimentation en courant externe ; ce qui les rend difficiles à autonomiser dans le cadre de l'intégration dans un biocapteur portable.

➤ La détection par résonance des plasmons de surface (SPR, LSPR et SERS)

Dans un mécanisme similaire à celui présenté dans la 2.2.2.1 pour l'exaltation de fluorescence à proximité d'une surface métallique, plusieurs modalités de détection reposent sur la mesure d'un signal optique après formation de plasmons dans une structure métallique. Ces techniques ont l'avantage de ne pas nécessiter de marqueurs contrairement aux capteurs fluorescents, colorimétriques, électrochimiques...

Dans les capteurs SPR traditionnels, la surface d'une couche métallique (Au, Ag ou Cu) dans laquelle les plasmons sont formés est excitée par une lumière polarisée selon un angle de résonance défini par un prisme. La détection se base sur la variation de l'angle de résonance. Cet angle est modifié quand des molécules se déposent sur la surface métallique. Dans les immunocapteurs avec détection SPR, les anticorps sont immobilisés sur une surface métallique et une lumière polarisée détecte la capture de l'antigène.

Les détecteurs LSPR (SPR localisé) offrent davantage de flexibilité dans la conception du capteur et reposent sur l'utilisation de nanoparticules métalliques. La mesure consiste à analyser la longueur d'onde nécessaire pour provoquer une extinction optique de la nanoparticule. Cette extinction optique est maximale à la fréquence de résonance des plasmons dont les pics d'extinction (absorption maximale de la lumière incidente) dépendent de l'indice de réfraction du milieu environnant. Les nanoparticules sont ainsi généralement en or ou argent car pour ces métaux, la fréquence de résonance des plasmons se situe dans la gamme de longueur d'onde du visible. Lors de la capture de l'analyte sur la nanoparticule, l'indice de réfraction de la surface change ce qui déplace le pic d'extinction.

Basé sur ce principe, Chen *et al* [121] ont combiné l'utilisation de la détection LSPR avec la microfluidique et l'observation en microscopie à champ sombre pour fabriquer un biocapteur capable de détecter 6 cytokines en parallèle avec une limite de détection de 5 pg/mL et 1 μ L d'échantillon de sérum humain en 40 minutes. Ils ont pour cela utilisé des nanotiges d'or dont la géométrie a été spécialement étudiée pour permettre une sensibilité maximale de la détection. Ces nanotiges ont été fonctionnalisées avec les anticorps de capture et déposées sur un substrat de verre par interaction électrostatique. Des canaux microfluidiques sont ensuite placés perpendiculairement aux motifs de nanotiges pour permettre l'injection des échantillons (voir Figure 1 - 8).

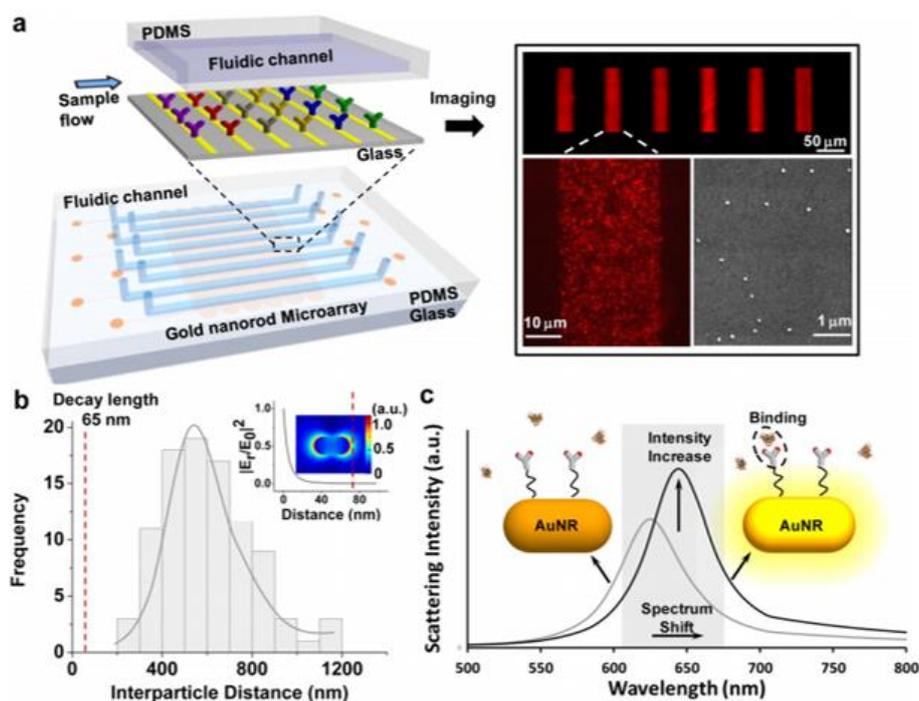


Figure 1 - 8. Principe du capteur LSPR de Chen *et al* [121]. **A.** Schéma de principe de la puce LSPR, avec le dépôt structuré de nanotiges d'or recouvert des canaux de PDMS. La puce est ensuite imagée en microscopie à champ sombre et microscopie électronique. **B.** Histogramme de la distance interparticulaires des nanotiges d'or sur la puce LSPR caractérisée en microscopie électronique. **C.** Principe de la détection par LSPR : les analytes sont capturés par les nanotiges d'or fonctionnalisées avec des anticorps. La capture de l'antigène produit un décalage et une modification de l'intensité de diffusion des plasmons de surface. Ce changement d'intensité est imagé à la fréquence caractéristique (zone grisée) en microscopie à champ sombre.

De même, Verano *et al* [122] ont ainsi développé un biocapteur « adipose-tissue-in-chip » à base de nanotiges d'or fonctionnalisées avec des anticorps pour l'analyse multiplexe de 4 cytokines (IL-6, TNF- α , IL-10 et IL-4) présents dans le tissu adipeux de patients obèses souffrant d'inflammation avec une limite de détection de 20 pg/mL.

Certaines stratégies ont consisté à amplifier le signal en augmentant la masse des espèces immobilisées à l'aide de nanoparticules ou de molécules supplémentaires (biotine, PEG, ...) afin d'améliorer la sensibilité de la détection au moment du greffage de l'analyte. Ainsi Martinez-Perdiguero *et al* [123] ont fabriqué un capteur SPR à base d'une surface d'or recouverte de monocouches autoassemblées d'acide mercaptoundecanoïque. Puis de l'éthanolamine a été utilisée pour limiter l'adsorption non spécifique des molécules issues de sérum humain sur la surface du capteur. La détection de TNF- α a alors été réalisée à partir d'un immunodosage en sandwich intégrant un anticorps de détection marqué avec des nanoparticules d'or afin d'amplifier le signal de détection. Une limite de détection de 11.6 pg/mL et 54.4 pg/mL a ainsi été atteinte dans du sérum artificiel et du sérum humain respectivement.

Une technique de détection similaire basée sur des mesures spectroscopiques Raman exaltées par les plasmons de surface (SERS) a aussi été intégrée aux biocapteurs de cytokines. La technique reste similaire aux mesures SPR mais ici c'est la diffusion Raman des photons issues de la surface que l'on mesure.

Wang *et al* [124] ont ainsi conçu un capteur immunologique à base de nanoparticules d'or pour les mesures SERS appliquée à la détection multiplexe de l'IFN- γ , l'IL-2 et le TNF- α sécrétés par des lymphocytes T avec une limite de détection de 0.5 pM.

Lai *et al* [125] ont également développé une méthode de quantification du TNF- α à partir d'un biocapteur composé de billes magnétiques biofonctionnalisées par des anticorps et permettant leur préconcentration. L'immunocomplexe formé sera composé de billes magnétiques/anticorps de capture/TNF- α /anticorps de détection, les anticorps de détection étant marqués avec des nanoparticules d'or pour la détection SERS. Ils ont ainsi pu atteindre une limite de détection de 1 pg/mL.

Les capteurs SPR et leurs dérivés sont donc des modes de détection intéressants car ils ne nécessitent pas de marqueur spécifique. En revanche, bien que des stratégies soient développées pour contourner les limites des capteurs SPR, les principaux obstacles restent l'instrumentation optique parfois complexe et la difficulté à éliminer l'adsorption non spécifique de molécules sur la surface du capteur. [98]

➤ La détection par microrésonateur en anneaux

Une dernière modalité existante pour l'immunodétection des cytokines est la mesure par microrésonateur en anneaux. Un guide d'onde (fibre optique par exemple) en forme d'anneau sert de support pour l'immobilisation d'anticorps. La fréquence d'une onde évanescente traversant le guide est modifiée en fonction de la quantité de cytokines immobilisées sur le guide d'onde. Ces capteurs ont l'avantage d'être peu coûteux à fabriquer, de ne pas nécessiter de marqueur spécifique (fluorophore, nanoparticules, ...) et d'offrir de très bonne sensibilité de détection.

Ainsi, Luchansky et Bailey [126] ont développé un capteur de ce type pour l'immunodétection de l'IL-2 avec une limite de détection de 100 pg/mL. Dans cette étude, un ensemble de microrésonateurs en anneaux à base de silicium a été réalisé et fonctionnalisé avec des anticorps pour la capture de l'IL-2. Comme pour les mesures SPR, l'utilisation d'un second anticorps de détection permet d'augmenter la masse du complexe et donc d'améliorer la sensibilité de la détection.

En revanche, comme pour les capteurs SPR, l'adsorption non spécifique d'espèces à la surface du capteur reste un obstacle important à surmonter.

Finalement, le développement de biocapteurs immunologiques pour la détection des cytokines est un domaine de recherche actif, bénéficiant de technologies variées, notamment l'optique, l'électrochimie et la photonique. Chaque modalité de détection présente des avantages mais aussi des inconvénients, que ce soit en termes de sensibilité, fabrication, instrumentation ou spécificité.

Dans la partie suivante, nous nous intéresserons à l'intégration des biocapteurs dans des dispositifs microfluidiques, qui, comme nous l'avons vu, peuvent grandement bénéficier à la portabilité, la rapidité, la sensibilité et l'économie de réactifs des analyses.

2.3. Intégration fluidique et matériaux flexibles

Nous avons vu dans la partie 1.3.4 l'intérêt de la miniaturisation et de l'intégration microfluidique des biocapteurs. Par ailleurs, le dispositif visé au-delà de cette thèse consistera en un capteur au format patch qui devra adhérer à la peau pour la captation de la sueur. Aussi, ces deux objectifs, intégration microfluidique et patch flexible, impliquent certaines contraintes dans le

choix des matériaux de fabrication. Nous allons présenter ici les différents matériaux possibles pour la conception d'un biocapteur flexible intégrant un circuit microfluidique.

Pour un capteur de type patch, la correcte adhérence et la conformabilité du dispositif avec la peau ne peuvent s'obtenir qu'en utilisant un matériau dont le module Young s'approche le plus possible de celui de la peau, soit environ 10^5 - 10^6 Pa [96]. En effet, la peau possède une certaine élasticité qui lui permet d'être déformée, étirée, comprimée, cisailée tout en épousant la forme du squelette musculaire. Si le dispositif installé ne possède pas des propriétés similaires, un décollement ou une délamination du substrat peuvent survenir ainsi qu'une perturbation des mesures effectuées si les surfaces de contact entre fluide et capteur sont modifiées.

En pratique, peu de matériaux permettent de répondre à ces critères. Seuls les textiles, les élastomères et quelques matériaux bioinspirés peuvent offrir des performances satisfaisantes (voir Figure 1 - 9) [95]. Pour les substrats plus rigides, un choix ingénieux de géométrie peut conférer au matériau une certaine déformabilité (par exemple en ajoutant des spirales, des hélices...). Xu *et al* [127] ont récemment fait une synthèse détaillée des différentes stratégies de conception des capteurs flexibles et relèvent quelques exemples pertinents de la littérature.

Par ailleurs, le choix d'un matériau polymérique va permettre l'intégration de technologies microfluidiques. La microfluidique permet de résoudre de nombreux problèmes inhérents aux biocapteurs portables de la sueur [128], notamment la manipulation de très faibles volumes de sueur et l'acheminement du fluide au niveau du capteur. Dans notre cas, le dispositif final visé nécessite la manipulation de différents réactifs et de billes magnétiques au sein d'une ou plusieurs chambres réactionnelles. Une conception microfluidique est donc indispensable pour le bon fonctionnement du biocapteur.

D'autre part, le papier et les textiles, bien que répondant aux critères de flexibilité et d'intégration microfluidique ne sont pas étirables ; ce qui rend leur utilisation limitée en tant que capteur intégré et capable de subir des déformations complexes sur le corps humain. Par ailleurs, ils ne sont pas optiquement transparents (sauf pour des membranes nanométriques mais extrêmement fragiles) ; ce qui limite les observations et mesures optiques (ex : fluorescence).

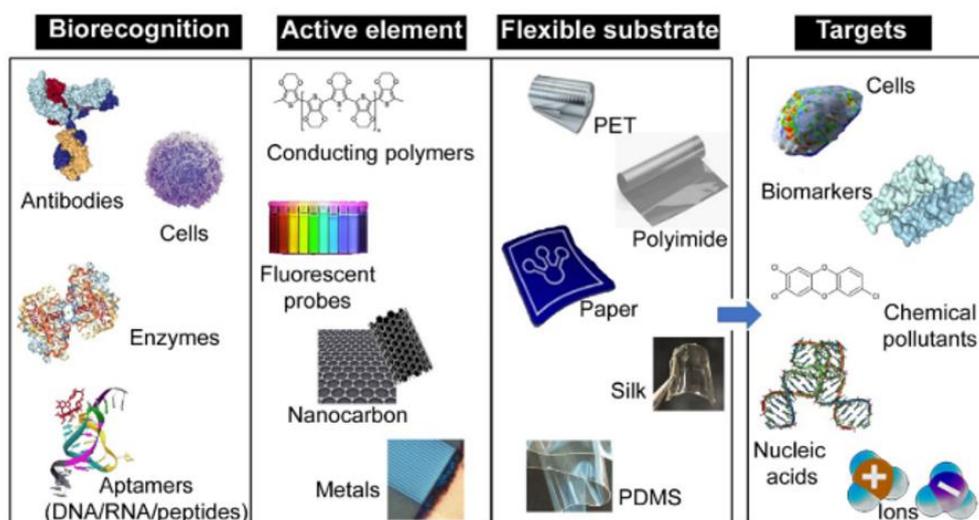


Figure 1 - 9. Les différents éléments d'un biocapteur flexible (adapté de [127])

Nous détaillerons donc ici les matériaux polymériques pouvant répondre aux deux critères de déformabilité et d'intégration microfluidique.

2.3.1. Thermoplastiques

Parmi les thermoplastiques utilisés en microfluidique, nous pouvons trouver le polyéthylène téréphtalate (PET) [129,130], le polyéthylène naphthalate (PEN), le cyclic olefin copolymer (COC) [131], le cyclic olefin polymer (COP) [132], le poly(méthylméthacrylate) (PMMA) [133], le polycarbonate (PC) [134] et le polystyrène (PS) [135]. Ces matériaux durs sont généralement structurés par moulage, pressage à chaud ou par ablation laser. Il est possible de les rendre flexibles en les transformant en films de quelques centaines de microns d'épaisseurs par lamination [127].

Ainsi, Hao *et al* [136] utilisent un film de PEN comme support flexible pour la conception d'un biocapteur du TNF- α reposant sur un transistor à effet de champ en graphène (GFET) fonctionnalisé avec des aptamères. Le film de PEN est protégé avec une couche de SiO₂ afin d'éviter de contaminer le graphène avec des résidus issus du PEN.

Tai *et al* [137] ont récemment développé un capteur portable de la sueur sous forme de bracelet sur un substrat de PET pour le suivi du dosage Levodopa, un médicament utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson. La détection est basée sur un capteur électrochimique par mesure ampérométrique *via* une électrode d'or nanostructurée déposée sur le film.

Lin *et al* [138] ont fabriqué une puce microfluidique flexible en PET pour un dispositif de captation de la sueur en superposant plusieurs films de 100 μm structurés par découpe laser. Ils ont pu déposer également des électrodes à la surface du PET pour doser le glucose présent dans la sueur par détection électrochimique.

Ce type de substrat semi-flexible permet l'intégration d'électronique souple comprenant des électrodes ou des surfaces de graphène. Cependant, leur intégration microfluidique reste très limitée par ces contraintes de structuration et difficile à mettre en place sans équipement adapté (presse hydraulique, laminoir, moule à injection, ...). Il n'est alors pas possible d'obtenir des structures microfluidiques plus épaisses, comme envisagé dans notre dispositif et conservant leur flexibilité.

2.3.2. Élastomères

Parmi les élastomères utilisés pour la fabrication de capteurs flexibles, deux types de matériaux se distinguent :

- les siloxanes (PDMS et Ecoflex);
- le polyimide (PI).

➤ Les siloxanes

Le PDMS est le matériau le plus connu et utilisé de la famille des siloxanes (polymère de silicone). Nous présenterons en détail dans le chapitre 2 les propriétés du PDMS qui sont au cœur des problématiques abordées par ce second chapitre. Le PDMS reste incontestablement le matériau de référence pour la microfluidique aujourd'hui et pour de nombreux biocapteurs flexibles [139]. C'est un élastomère à longue chaîne avec une flexibilité et élasticité modulable en fonction de son mode de fabrication (ratio de monomère/réticulant). La flexibilité du PDMS permet notamment de l'utiliser comme valves et pompes dans des systèmes microfluidiques complexes pour l'acheminement de différents réactifs, comme pour un test ELISA sur puce [140,141]. C'est un matériau peu cher, facile à assembler et à modifier chimiquement. Il est transparent, biocompatible,

stable chimiquement et thermiquement. C'est donc un matériau de choix pour le prototypage de laboratoires sur puce dans le milieu académique. En revanche, il est plus rarement utilisé dans le milieu industriel car la production en masse de dispositifs en PDMS reste compliquée. L'Ecoflex est un autre élastomère de la famille des siloxanes, plus flexible et étirable que le PDMS [142,143]. Yeo *et al* [142] ont notamment assemblé les deux matériaux pour la conception d'un capteur tactile. Le PDMS a servi comme substrat d'accueil pour deux électrodes de cuivre tandis que le canal microfluidique a été moulé dans l'Ecoflex avant d'être assemblé avec le PDMS.

➤ Le polyimide

Le polyimide est un polymère flexible biocompatible, stable chimiquement et thermiquement. Il est souvent utilisé pour la conception de substrat flexible. Baraket *et al* [144] ont ainsi fabriqué un capteur électrochimique flexible pour le TNF- α en déposant une électrode d'or sur un substrat de polyimide de 125 μm (Kapton). Il peut également être rendu photosensible et structuré par photolithographie pour permettre la fabrication de puce microfluidique [145]. L'assemblage de plusieurs éléments de polyimide peut être réalisé ensuite par lamination ou utilisation de couche sacrificielle [146]. Metz *et al* [147] ont ainsi pu élaborer une structure microfluidique flexible en polyimide intégrant des microélectrodes pour le suivi de l'activité électrique entre cellules. Zulfiqar *et al* [148] ont également développé un procédé de fabrication de microcanaux de polyimide à partir d'une gravure sèche des canaux dans le matériau et un scellage de la puce à l'aide de polyimide partiellement recuit. Par ailleurs, le polyimide est très résistant au solvant et constitue une bonne alternative au PDMS pour des réactions en milieu organique. Cependant, contrairement au PDMS, il est opaque ; ce qui rend le suivi des réactions et certaines méthodes de détection optique impossible.

2.3.3. **Biomatériaux**

Les biomatériaux constituent des alternatives intéressantes aux polymères synthétiques car ils sont généralement basés sur des protéines ; ce qui facilite leur modification chimique. Ils sont par ailleurs naturellement biocompatibles.

➤ Les protéines la soie (fibroïne)

Les fibroïnes de soie sont les protéines issues des cocons de vers à soie. Ce sont des protéines de structures composées de glycine, sérine et alanine. La fibroïne de soie est biocompatible, biodégradable, flexible et résistante. Elle résiste par ailleurs relativement bien à la protéolyse [149]. Des travaux ont ainsi été menés afin de l'utiliser comme substrat flexible pour la conception de capteur. La fibroïne est généralement extraite de cocons de vers à soie bouillis dans une solution de Na_2CO_3 afin d'éliminer les protéines de séricine entourant la fibroïne. Puis la fibroïne purifiée est dissoute dans une solution de LiBr à 60°C pendant plusieurs heures. La solution est ensuite dialysée avant d'être utilisée [150]. Xu et Yadavalli [151] ont ainsi récemment développé un biocapteur à impédancemétrie flexible et biodégradable pour la détection du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Pour cela, ils ont rendu la fibroïne photosensible afin de structurer le substrat et ont réalisé des électrodes à partir d'une encre conductrice constituée de fibroïne et PEDOT : PSS. Des anticorps immobilisés dans l'encre conductrice permettent la détection du VEGF par spectroscopie d'impédance. La fibroïne a également été utilisée par Bettinger *et al* [152] pour la fabrication de puces microfluidiques avec un protocole similaire à la *soft lithography* utilisée pour le moulage du PDMS. Pour cela, une solution aqueuse de fibroïne a été

coulée sur un moule négatif des canaux en PDMS et décollée après durcissement. La puce est ensuite scellée avec un film de fibroïne placé sur le canal et recuit pendant 18h à 70°C. Les auteurs indiquent également que la conjugaison de biomolécules par bioconjugaison avec EDC/S-NHS est possible sur la fibroïne.

2.3.4. Autres matériaux

➤ Le parylène

Le parylène est un polymère de la famille des thermoplastiques mais sa structuration est très différente des autres thermoplastiques présentés précédemment. Aussi, nous avons fait le choix de l'aborder séparément. En effet, le dépôt de parylène est effectué en phase vapeur dans un bâti sous vide et à température ambiante. L'intérêt de ce type de dépôt est qu'il permet d'épouser totalement la forme du substrat et d'offrir une conformabilité remarquable avec des très fines épaisseurs de polymère (quelques centaines de nanomètres). Le parylène est par ailleurs biocompatible ; ce qui en fait un matériau de choix pour l'encapsulation de dispositifs et implants médicaux [153]. Il est flexible, bien qu'il soit plus rigide que le PDMS. Néanmoins, déposé en film très fin, sa déformabilité est excellente tout en apportant une certaine rigidité [154]. L'épaisseur du film de parylène est simplement contrôlée par le temps de dépôt et la quantité de précurseur de polymérisation. Jung *et al* [155] ont ainsi réalisé et structuré des films de parylène de 15 µm sur un moule de PDMS comportant un canal microfluidique. Le film de parylène peut être retiré du substrat en traitant le PDMS avec un plasma O₂ avant dépôt. Ceci permet d'obtenir un film de parylène indépendant et structuré pour la fabrication d'une puce microfluidique en parylène. Le scellage de la puce par un autre film de parylène a nécessité un procédé de collage par iCVD avec du PGMA. Pourtant, l'utilisation d'installations complexes pour la fabrication de substrats de parylène ainsi que le coût des précurseurs restent des limites à son utilisation pour la production de puce microfluidique flexible en parylène.

➤ Les OSTE (Off-stoichiometry Thiol-ene)

Les OSTE sont des polymères contenant un excès de groupes thiol et allyles libres, non réagis qui peuvent être liés ensemble par exposition aux UV. Ils peuvent être structurés par *soft lithography* comme le PDMS et une fois exposés aux UV, permettent l'obtention de structures flexibles. La quantité de groupes thiols et allyles restant dans le polymère recuit et les propriétés mécaniques du matériau sont fixées par les proportions de départ du mélange [156]. Cela permet d'obtenir des groupes fonctionnels libres en surface et dans le volume du polymère et offre des possibilités pour la fonctionnalisation de surface. Carlborg *et al* [157] ont ainsi démontré la versatilité des propriétés et des applications des OSTE en microfluidique, de la fabrication de structure flexible (valves), de puce hydrides avec du PDMS, en passant par la modification de surface et le collage en une étape, jusqu'à des structures plus rigides, en altérant les ratios du mélange initial des monomères. Les matériaux obtenus sont stables chimiquement et optiquement transparent. En revanche, la biocompatibilité de ces matériaux reste à démontrer.

Pour résumer, il existe une variété de matériaux flexibles et intégrables en microfluidique. En revanche, peu d'entre eux répondent aux critères de haute déformabilité, élasticité, robustesse, transparence optique, biocompatibilité, faible coût de production et facilité de fabrication indispensable pour la conception d'un biocapteur sous forme de patch. Le PDMS reste à ce jour le

matériau répondant le mieux à tous ces critères et est particulièrement bien connu des laboratoires de biologie pour les applications médicales.

Par ailleurs, nous avons vu dans les parties précédentes que la conception d'un biocapteur nécessite l'immobilisation de biorécepteurs sur un support (surface ou micro/nanoparticules). En choisissant d'intégrer un matériau polymérique comme support du biocapteur, il s'agit désormais de s'intéresser aux méthodes de fonctionnalisation de ces matériaux en vue du greffage covalent de biorécepteurs à leur surface.

2.4. Fonctionnalisation des surfaces de polymères

La fabrication d'un biocapteur microfluidique flexible à base de polymère implique de maîtriser l'immobilisation des biorécepteurs à la surface du polymère. En effet, la plupart des polymères étant inertes chimiquement, il est nécessaire de fonctionnaliser leur surface avec des groupements chimiques afin d'y greffer les biorécepteurs. L'optimisation de cette étape de fonctionnalisation permettra d'obtenir une surface présentant les groupements réactifs choisis de manière contrôlée. Dans la plupart des biocapteurs, il sera en effet souhaité de maximiser le nombre de groupements réactifs afin d'immobiliser le plus de biorécepteurs possibles et accroître la sensibilité de la détection.

Cette immobilisation peut être non-covalente ou covalente. Les méthodes non-covalentes reposent sur des interactions électrostatiques ou de Van der Waals entre la surface du polymère et l'espèce à immobiliser [158,159]. Cependant, la physisorption d'une biomolécule sur une surface peut modifier sa conformation et altérer son activité biologique [160]. D'autres méthodes reposent aussi sur des paires ligand-récepteur comme l'interaction biotine-avidine dont l'affinité et la stabilité sont très élevées [160]. En revanche, cette méthode nécessite la modification préalable de l'espèce à immobiliser.

Aussi, contrairement aux méthodes non-covalentes, l'immobilisation covalente permet d'obtenir une meilleure stabilité entre la surface et le biorécepteur et ainsi d'améliorer la qualité et reproductibilité des analyses [161–163].

Ainsi, dans cette partie, nous nous concentrerons uniquement sur les méthodes de fonctionnalisation de surface dans le but d'assurer un greffage covalent des biorécepteurs.

Tout comme il existe une variété de matériaux polymériques, il existe une variété de techniques de fonctionnalisation. Ces techniques peuvent être classées selon les conditions de réaction en phase liquide ou en phase gazeuse.

2.4.1. En phase liquide

2.4.1.1. Les monocouches autoassemblées (SAMs)

Les monocouches autoassemblées sont des assemblages moléculaires plus ou moins ordonnés formés spontanément sur une surface par adsorption ou greffage de molécules organiques. Dans la plupart des cas, ces molécules possèdent un groupe d'accroche présentant une forte affinité pour la surface, une chaîne et un groupe terminal. La chimisorption du groupe d'accroche sur la surface peut se faire en phase liquide ou en phase vapeur. Ce groupe doit être adapté à la nature du substrat sur lequel le greffage a lieu (substrat métallique ou oxyde). L'organisation de la chaîne et du groupe terminal en structure ordonnée se fait plus lentement, mais aboutit à la fin à une monocouche

tridimensionnelle ordonnée (voir Figure 1 - 10). La densité de la structure formée dépend alors des interactions latérales entre les chaînes des molécules constituant la monocouche.

Les groupes d'accroches les plus utilisés sont :

- les thiols (-SH) qui s'adsorbent sur des surfaces métalliques nobles (Au, Pt, Pd,...) ou du graphène
- l'acide phosphonique (-PO₃H₂) pour certains oxydes (SiO₂, ITO, TiO₂)
- les silanes (-SiX₃ où X=Cl, OMe, OEt) pour les oxydes (SiO₂, Al₂O₃) et les surfaces comportant des groupements silanols -SiOH (PDMS oxydé par exemple)

➤ Les thiols

Les biocapteurs électrochimiques reposant sur la fonctionnalisation d'électrodes utilisent principalement les SAMs. Notamment, la fonctionnalisation des électrodes d'or [164] ou des nanoparticules d'or repose essentiellement sur l'utilisation des thiols. Ainsi, pour la conception de leur capteur électrochimique du TNF- α , Baraket *et al* [144] ont utilisé l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHDA) pour fonctionnaliser une électrode d'or. Pour cela, ils ont incubé leur électrode toute une nuit dans une solution comprenant 800 μ L d'éthanol pur avec 10 mM de MHDA à 4°C (voir Figure 1 - 11). L'utilisation du MHDA permet d'obtenir des groupements acides carboxyliques pour la conjugaison ultérieure avec les anticorps.

Arya *et al* [119] ont utilisé le dithiolbissuccinimidyl propionate (DTSP) pour former une SAM sur une électrode d'or et permettre la conjugaison sans intermédiaire d'anticorps anti-TNF- α par attaque nucléophile des groupements amines de l'anticorps sur les groupements réactifs succinimidyl de l'électrode. La SAM a été formée simplement en immergeant l'électrode dans une solution de DTSP pendant 1h à 22°C.

➤ Les silanes

Concernant les oxydes et les polymères, les silanes sont plus souvent utilisés pour la fonctionnalisation au travers de réactions de silanisation. Les silanes sont des composés organiques contenant un atome de silicium. Ils peuvent être monofonctionnels (R₃SiX), bifonctionnels (R₂SiX₂) ou trifonctionnels (RSiX₃) où R est une chaîne carbonée de longueur et terminaison variables (-COOH, -NH₂, -SH...) et X un groupement d'accroche facilement hydrolysables (-Cl, -F, -OR ou -NMe₂). Les silanes trifonctionnels sont les plus étudiés et utilisés pour leur grande réactivité. Sur une surface comprenant des groupements silanols (-SiOH), la silanisation résulte en la formation d'une liaison siloxane Si-O-Si entre la surface et le silane.

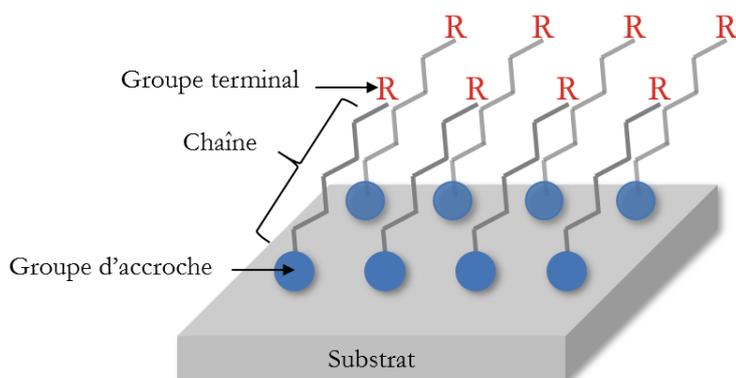


Figure 1 - 10. Schéma représentatif des composants d'une monocouche autoassemblée (SAM) greffée à un substrat

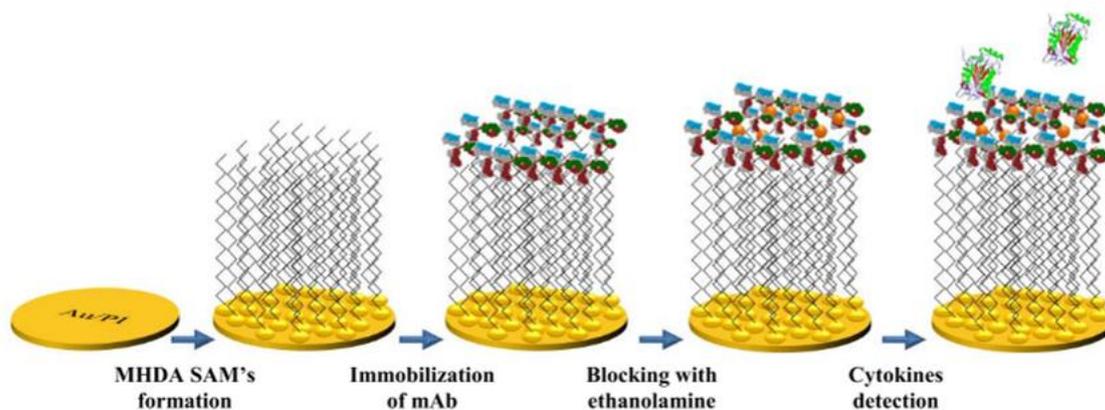


Figure 1 - 11. Fonctionnalisation d'une électrode d'or par une SAM de MHDA (adapté de [144])

Les alkylsilanes et les aminosilanes figurent parmi les plus étudiés à ce jour, notamment pour la fonctionnalisation de surface de silicium oxydée ou de silice [165–167]. Plusieurs morphologies de surface peuvent être obtenues en fonction des conditions de réaction (solvant, température, temps, concentration, hygrométrie)[167]. Les silanes sont particulièrement sensibles à l'eau. Les réactions ont le plus souvent lieu en atmosphère contrôlée, dans des solvants organiques (toluène, acétone, éthanol, chloroforme).

L'aminopropyltri(éthoxy)silane (APTES) est particulièrement utilisé car il permet d'obtenir une fonction amine libre en surface, facilitant la conjugaison avec des protéines. Kim *et al* [166] ont notamment décrit le mécanisme de formation des couches d'aminosilanes sur des surfaces de silicium. La quantité d'eau dans le solvant et en surface de l'échantillon est cruciale car elle détermine la vitesse d'hydrolyse des chaînes de silane pour la réaction de condensation entre les silanes et les groupements silanols en surface. L'hydrolyse incontrôlée des silanes en solution peut provoquer une polymérisation des molécules de silane entre elles, ce qui sera délétère pour la formation d'une monocouche organisée. Notre équipe de recherche a par ailleurs travaillé sur la conception d'immunocapteur à partir de surface de silicium silanisée [168,169].

Concernant les polymères, la silanisation est également utilisée après une étape d'activation de surface afin de former des groupements silanols en surface. Cette activation peut être physique par plasma O_2 , traitement UV ou décharge corona [170] ou chimique par un mélange $H_2O/H_2O_2/HCl$ [171–173]. La silanisation du PDMS a ainsi été réalisée par plusieurs équipes.

Séguin *et al* [174] ont silanisé du PDMS avec du 3-APTMS et du 3-MPTMS pour obtenir respectivement des fonctions amines et thiols en surface. Ils ont utilisé un masque en aluminium afin de sélectivement fonctionnaliser des zones définies de la surface à l'aide d'une solution de silane dans du méthanol après oxydation par plasma de la surface. Les fonctions thiols et amines créées ont permis l'immobilisation de nanoparticules d'or et la conjugaison de fluorophores. Puis le PDMS fonctionnalisé a été utilisé pour la conjugaison avec des IgG à l'aide de protéine A.

Yu *et al* [172] ont proposé un procédé de silanisation sous flux de canaux de PDMS. Pour cela, les canaux de PDMS préparés sont oxydés par une solution de $H_2O/HCl/H_2O_2$ en ratio 5 : 1 : 1 pendant 5 minutes puis rincés à l'eau déionisée et l'éthanol. Une solution d'APTES à 50% dans l'éthanol est ensuite injectée pendant 30 minutes à 2 $\mu L/min$. Le canal est rincé à l'éthanol et l'eau déionisée. La surface ainsi préparée a ensuite été utilisée pour un immunodosage de l'IL-5 au moyen

d'anticorps greffée sur du dextrane oxydé servant à la fois de protection contre l'adsorption non spécifique et comme intermédiaire de bioconjugaison avec les anticorps (voir Figure 1 - 12). Sui *et al* [171] ont utilisé un protocole similaire de silanisation sous flux de canaux de PDMS pour l'immobilisation de brins d'ADN.

Dong *et al* [175] ont quant à eux développé un biocapteur optique à base de PMMA. Les canaux de PMMA ont été activés par plasma O_2 et mis en contact avec une solution d'APTES à 1% dans l'éthanol. La surface a ensuite été passivée avec du PEG biotinylé avant l'immobilisation d'anticorps pour la détection optique d'IL-8, IL-1 β et MMP-8 par immunodosage à l'aide de nanoparticules d'or. Melnik *et al* [176] ont également proposé un procédé de silanisation du polyimide par le MPTMS pour la fabrication d'un biocapteur photonique pour le suivi de l'hybridation de brins d'ADN.

La silanisation est donc un procédé applicable sur de nombreuses surfaces, oxydes comme polymériques. La grande variété des silanes disponibles permet aussi de choisir le groupe fonctionnel qui sera présent en surface pour l'adapter à la réaction de bioconjugaison des biomolécules. Certains protocoles ont même été développés en microfluidique, montrant la grande flexibilité de ce type de réaction. Néanmoins, la qualité de l'activation de la surface ainsi que les conditions de réactions sont à surveiller afin de s'assurer de la stabilité des couches de silane déposées.

De manière générale, il est également possible de recourir à l'utilisation de SAMs pour des supports de polymère en déposant des couches métalliques ou d'oxydes à leur surface par pulvérisation ou évaporation. Une fois les matériaux déposés, les protocoles de fonctionnalisation reposent sur les principes de formation des SAMs sur ce type de surface.

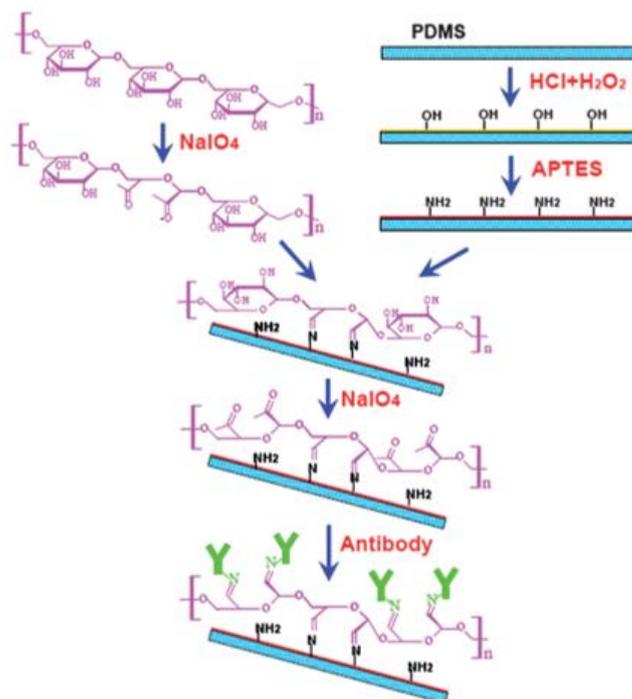


Figure 1 - 12. Schéma du protocole de silanisation de canaux de PDMS par l'APTES et l'immobilisation d'anticorps à l'aide de dextrane oxydé (adapté de [172])

2.4.1.2. Greffage par polymérisation contrôlée

Le greffage covalent de polymère sur des surfaces par polymérisation contrôlée repose sur la création de couches denses de polymère à partir de monomères adsorbés à la surface et activés par exposition aux UV ou par plasma. Cette exposition permet de créer des radicaux libres qui amorceront la réaction de polymérisation des monomères. L'avantage de cette technique est la grande variété de monomères disponibles afin d'obtenir des fonctions variées en surface [177]. La Figure 1 - 13 montre le mécanisme réactionnel pour des surfaces de PDMS.

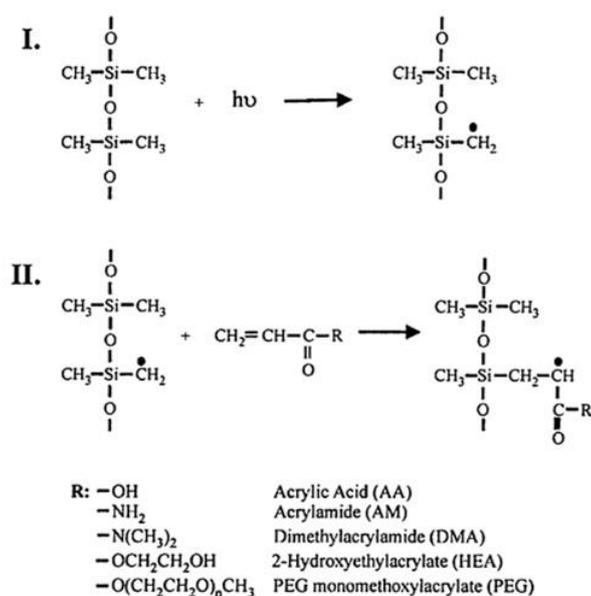


Figure 1 - 13. Mécanisme de la réaction de polymérisation induite par UV sur du PDMS. I. Formation des radicaux à la surface du PDMS par exposition aux UV. II. Initiation de la polymérisation, R état le groupement latéral du monomère (adapté de [178])

He *et al* [179] ont ainsi pu modifier du PDMS avec des groupements cyano -CN pouvant ensuite servir de point d'ancrage pour des biomolécules. Pour cela, ils ont traité la surface avec un plasma d'un mélange d'argon et de dihydrogène afin de former des radicaux en surface du PDMS. Puis le substrat a été immergé dans une solution d'acrylonitrile pendant 4h. Ishihara *et al* [180] ont utilisé une réaction de greffage induit par un faisceau d'électron au sein d'un canal de PDMS rempli avec du glycidyl methacrylate (GMA). Les groupements époxy créés en surface ont permis ensuite l'immobilisation de brins d'ADN pour la détection de microRNA.

2.4.1.3. Le revêtement biocompatible

Les matériaux naturels ou bioinspirés sont généralement issus de matériaux protéiques dont les propriétés mécaniques et la biocompatibilité constituent des avantages notables pour la structuration de biocapteurs. Certains d'entre eux comme la polydopamine ont récemment attiré l'attention pour servir de revêtement biofonctionnalisable pour différents matériaux.

La polydopamine (PDA) est un matériau bioinspiré de la protéine permettant aux moules de se maintenir fixées sur un rocher. [181] Cette dernière utilise une protéine contenant de la 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) et de la lysine ; ce qui a guidé les chercheurs vers l'intérêt de mélanger des groupements amine et catéchol pour obtenir une forte adhésion mécanique. La

polydopamine contient ainsi ces deux groupements. Son protocole de revêtement est particulièrement facile ; ce qui a ouvert la voie à plusieurs applications dans le domaine biomédical.

La polydopamine est formée spontanément par une polymérisation oxydante de chlorhydrate de dopamine en milieu basique. Pour que le revêtement d'une surface ait lieu, il suffit de l'immerger dans une solution aqueuse de dopamine. L'épaisseur du revêtement est contrôlée par le temps de dépôt, bien que le mécanisme exact soit encore méconnu [182]. Néanmoins, ce type de revêtement possède des fonctions amines à sa surface et permet donc d'y greffer de nombreuses molécules différentes, comme illustré par la Figure 1 - 14 [183]. D'autres méthodes de dépôt sont aussi développées afin d'améliorer la qualité des dépôts et la vitesse de polymérisation ou encore de pouvoir libérer les films déposés pour les rendre manipulables [184].

Toma *et al* [110] ont utilisé la polydopamine (PDA) comme revêtement biofonctionnel pour l'immobilisation d'anticorps anti-IL-6 dans un capteur SPR. La PDA a été déposée sur une surface d'or selon la méthode précédemment décrite pendant 10 minutes pour former un film de 1.3 nm. Les anticorps de capture ont été immobilisés à sa surface avant la détection de l'IL-6 par un immunodosage en sandwich avec un anticorps fluorescent. La surface du capteur a pu être régénérée pour permettre plusieurs mesures en utilisant une solution de HCl à 0.1 M pour retirer les anticorps adsorbés ; aucune modification du revêtement n'a été observée. La PDA semble donc offrir des performances remarquables pour le revêtement de surfaces variées afin de les rendre biofonctionnelles. Néanmoins, davantage de recherches doivent être menées afin de bien comprendre ses mécanismes de formation, sa stabilité et limiter l'adsorption non spécifique de protéines à sa surface.

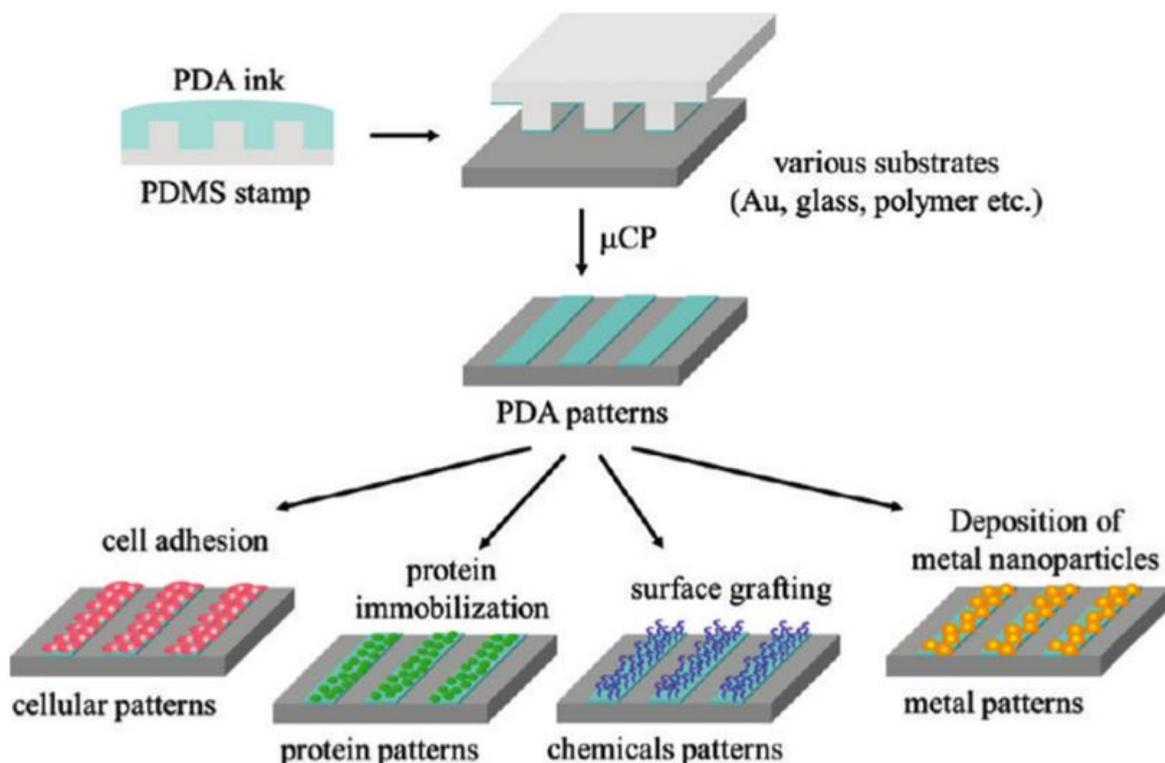


Figure 1 - 14. Schéma illustrant la variété de préparation obtenue en microstructurant un dépôt de PDA par microimpression (adapté de [183])

2.4.2. En phase vapeur

D'autres méthodes de fonctionnalisation de surface reposent sur des procédés en phase vapeur.

2.4.2.1. Silanisation en phase vapeur

La réaction de silanisation précédemment présentée est également réalisable en phase vapeur pour fonctionnaliser des surfaces. Elle permet d'éviter d'utiliser des solvants et limite les risques d'agrégation des silanes en évitant le contact direct entre la surface et les oligomères formés dans la solution de silane. Les monocouches obtenues sont généralement de bonne qualité [167].

Le procédé est généralement assez simple et consiste à laisser le substrat à recouvrir dans une enceinte sous vide avec un récipient contenant le silane à déposer [185]. La température du montage peut aussi être modifiée pour adapter l'évaporation du silane et la vitesse de réaction.

2.4.2.2. Le dépôt chimique en phase vapeur (CVD)

Le dépôt chimique en phase vapeur consiste à déposer des couches minces inorganiques sur la surface d'un échantillon en faisant réagir des précurseurs gazeux dans une enceinte sous vide. Une autre forme de CVD, appelé *initiated CVD (iCVD)* utilise ce même principe mais appliqué aux polymères sans nécessiter de solvant particulier. Les précurseurs employés permettent ainsi de créer des films minces de polymères avec une variété de fonctions chimiques permettant la conjugaison avec d'autres molécules [186].

Xu et Gleason [187] ont ainsi déposé des films de polyaminostyrène (PAS) sur différents substrats : silicium, PDMS, COC, PC, PET, PE, verre et polyacrylate. Pour cela, du 4-aminostyrène est injecté dans l'enceinte contenant le substrat maintenu sur un support à 50°C. Le filament à l'intérieur de l'enceinte est chauffé à 260°C ce qui permet la formation des espèces réactives qui se déposent en surface. La réactivité des amines formées à la surface du film sur les différents substrats a été évaluée en y greffant des quantum dots.

Un procédé mélangeant la silanisation en phase vapeur et la CVD, appelé « silanisation en phase vapeur activée » a également permis la fonctionnalisation de surface de silicium. Pour cela, de l'APTES est placé dans une enceinte et évaporé. Les vapeurs sont déplacées dans une autre enceinte où elles sont chauffées pour décomposer le silane puis dans une enceinte contenant le substrat. La couche de silane obtenue a été comparée à des silanes déposés par silanisation en phase liquide, et montre une densité de fonction amine trois fois plus importante [188] et une meilleure stabilité pour le greffage d'enzyme [189].

2.4.2.3. Le dépôt par plasma

Lorsqu'un substrat est soumis à un plasma, la génération d'espèces actives au sein du gaz environnant peut permettre la formation de groupements chimiques en surface de l'échantillon. Aussi, en fonction de la nature du gaz, différentes fonctionnalités chimiques peuvent être déposées [170]. Nous avons vu précédemment que le plasma O₂ était notamment utilisé pour activer la surface de PDMS pour les réactions de silanisation en générant des groupements hydroxyles à la surface du polymère. L'avantage des traitements par plasma est qu'ils permettent de modifier uniquement les quelques premiers nanomètres du substrat sans altérer le volume du matériau. Par ailleurs, la plupart des traitements ne durent que quelques minutes.

Pruden *et al* [190] ont ainsi utilisé un plasma à base d'ammoniaque (NH_3) pour former directement des groupements amines en surface du PDMS. Ces groupements peuvent ensuite servir pour la conjugaison de biomolécules. Wang *et al* [191] ont introduit des fonctions carboxyliques et amines sur du polystyrène en le traitant avec un plasma contenant du CO_2 et du N_2 . D'autres fonctions acides ou basiques ont été formées et ouvrent des possibilités pour une variété de réaction de bioconjugaison.

Néanmoins, les traitements par plasma peuvent parfois dégrader la surface du polymère en provoquant des craquements et des fissures. Les conditions de plasma (puissance, temps, pression) doivent être finement ajustées afin de ne pas endommager le matériau [191,192].

Pour résumer, il existe donc différentes méthodes de fonctionnalisation permettant d'obtenir des fonctionnalités chimiques en surface des matériaux polymériques utilisés pour la conception des biocapteurs. La méthode choisie doit notamment permettre de générer suffisamment de groupements réactifs en surface afin d'offrir une densité d'immobilisation optimale pour les biomolécules. Par ailleurs, le choix de la méthode de fonctionnalisation devra aussi prendre en compte la compatibilité avec le matériau à fonctionnaliser (température, solvant). Enfin, la facilité de mise en œuvre du traitement chimique devra également être un critère afin de permettre de traiter rapidement et efficacement une variété d'échantillons pour la fabrication des biocapteurs sans nécessiter d'installation complexe.

2.5. Conjugaison des surfaces avec les anticorps

Une fois le matériau fonctionnalisé avec des groupements chimiques réactifs (amine, acide carboxylique, ester, ...), il est nécessaire de s'intéresser aux réactions permettant de lier le biorécepteur à la surface de l'échantillon. Comme expliqué précédemment, un greffage covalent du biorécepteur reste la meilleure stratégie pour assurer la qualité d'analyse du biocapteur. Par ailleurs, la méthode utilisée ne devra pas altérer la fonctionnalité du biorécepteur en provoquant sa dénaturation, même partielle.

Dans la perspective de la fabrication d'un immunocapteur, nous détaillerons ici le principe de greffage et de détection de l'analyte par conjugaison d'anticorps sur une surface. Puis nous présenterons différentes réactions permettant de conjuguer un anticorps à un substrat fonctionnalisé. Les réactions mises en jeu pourront néanmoins dans la plupart des cas être transposées à d'autres types de protéines partageant les mêmes groupements chimiques que les anticorps.

2.5.1. Principe de l'immunodosage

En conjuguant des anticorps à un support (substrat ou particule), la détection de l'analyte se base généralement sur le principe de l'immunodosage. Ce principe a été brièvement abordé dans la partie 1.3.5 car il réside au cœur des méthodes de quantification de cytokines actuellement utilisées en laboratoire (ELISA, réseau d'anticorps, test à flux latéral, ...). Il existe trois principaux formats d'immunodosage : direct, indirect et « sandwich » (voir Figure 1 - 15).

Dans l'immunodosage direct, l'antigène est immobilisé sur une surface et un anticorps détecte sa présence. Un signal mesurable (colorimétrique, fluorescence, électrochimique ...) est ensuite émis afin de permettre de quantifier la quantité d'anticorps immobilisés et donc la quantité

d'antigènes capturés. Le signal mesurable est issu d'un marqueur comme une enzyme après digestion d'un substrat, un fluorophore, un radioisotope, de l'ADN... généralement conjugué à l'anticorps de détection. Il est aussi possible d'utiliser des techniques de mesures ne nécessitant pas de marqueur (SPR, microrésonateur, QCM...)

L'immunodosage indirect repose sur le même principe mais un anticorps primaire est d'abord ajouté pour assurer une détection plus spécifique de l'antigène. Puis un anticorps secondaire marqué permet la détection de l'anticorps primaire.

Enfin l'immunodosage en « sandwich » nécessite d'abord l'immobilisation d'un anticorps de capture pour la reconnaissance de l'antigène, puis un anticorps de détection reconnaissant un épitope (marqueur spécifique de l'antigène) différent de l'anticorps de capture. Ce format est le plus utilisé car il permet d'améliorer la spécificité et la sélectivité de la reconnaissance. Un troisième anticorps est parfois utilisé. L'anticorps de détection (anticorps primaire) étant spécifique de l'antigène, il est souvent compliqué et coûteux de modifier l'anticorps primaire avec un marqueur. Aussi, un troisième anticorps (anticorps secondaire) marqué et orienté vers l'hôte de l'anticorps primaire permet la détection en réduisant les coûts de production d'anticorps marqué, non spécifique de l'antigène.

La qualité de l'immobilisation des anticorps sur la surface est déterminante pour les performances de la détection. L'orientation de l'anticorps de capture sur la surface est particulièrement importante pour assurer une capture efficace de l'antigène par le fragment de l'anticorps impliqué dans la reconnaissance biologique (région Fab). Ces notions seront abordées plus en détail dans le chapitre 3 portant plus précisément sur l'orientation des anticorps.

La nature de la surface et le choix de la technique de bioconjugaison de l'anticorps avec la surface sont déterminants dans l'obtention d'un greffage de qualité. Heureusement, il existe une grande variété de réactifs de bioconjugaison ainsi que différentes techniques permettant de stabiliser les anticorps greffés sur la surface.

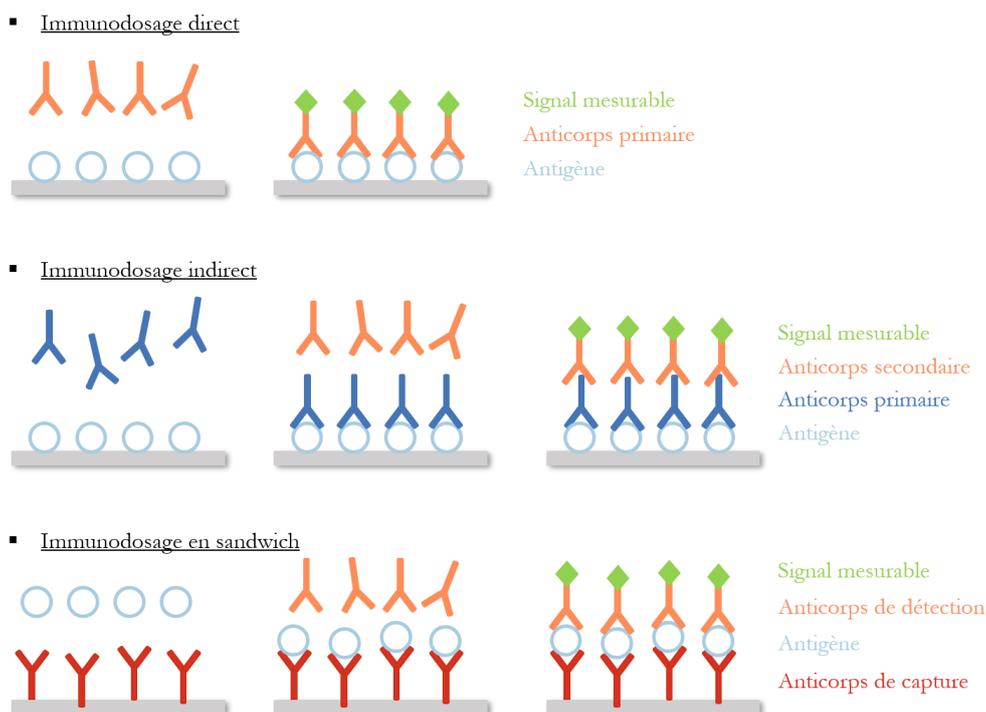


Figure 1 - 15. Les différents formats d'immunodosage

2.5.2. Techniques de bioconjugaison des anticorps sur une surface

La fonction chimique créée en surface du matériau constitutif du biocapteur doit être compatible avec les groupes réactifs sur la molécule à immobiliser. Le plus souvent, les fonctions chimiques utilisées pour la bioconjugaison sont les thiols (-SH), les amines primaires (-NH₂), les acides carboxyliques (-COOH), les groupements hydroxyles (-OH) et les aldéhydes (-CHO).

Pour l'immobilisation d'anticorps (et de protéines en général), la variété des acides aminés présents sur la biomolécule permet généralement d'utiliser une de ses fonctionnalités comme site de greffage : cystéine pour les groupements thiols, lysine pour les groupements amines, aspartate et glutamate pour les groupements carboxyliques, ...

De nombreux réactifs de bioconjugaison reposant sur la création d'une liaison covalente entre ces différents groupes sont disponibles. Le livre de Greg Hermanson *Bioconjugate Techniques* figure parmi une des références faisant l'inventaire de ces réactifs et des méthodes de bioconjugaison existantes [193]. Les revues de Kim *et al* [160] et Wong *et al* [163] présentent également en détails les différentes techniques de greffage covalent de protéines sur des surfaces.

Les conditions réactionnelles affecteront aussi les réactions de bioconjugaison. Aussi, la nature des réactifs utilisés dépendra entre autres du pH, du solvant et de la température. Ces paramètres devront être choisis en accord avec la surface et les molécules à utiliser. Dans le cas des anticorps, les conditions assurant la stabilité des molécules sont généralement un pH neutre ou légèrement acide/basique en fonction des charges souhaitées en surface de la protéine, des températures modérées (<40°C) pour éviter une dénaturation des protéines, et un solvant aqueux (tampon type PBS, MES, Tris...).

Parmi les réactifs de bioconjugaison les plus utilisés, nous retrouvons les esters de N-hydroxysuccinimide (NHS). Un dérivé, le sulfo-NHS est plus couramment utilisé en milieu aqueux pour sa meilleure solubilité. Les esters de NHS permettent l'activation des amines en formant des amides. La famille des carbodiimides est souvent utilisée avec le NHS afin de coupler des fonctions acides carboxyliques et amines entre elles en formant un amide. L'EDC seul permet cette réaction mais l'intermédiaire réactionnel formé est instable et est facilement hydrolysé en milieu aqueux. Aussi, l'utilisation de S-NHS permet de former un intermédiaire plus stable pour favoriser la conjugaison entre un anticorps et une surface contenant des fonctions amines (voir Figure 1 - 16).

En revanche, la répartition des groupements carboxyliques le long des chaînes de l'anticorps étant variées, l'immobilisation peut se faire à différents endroits, occasionnant une orientation qualifiée de "aléatoire". Néanmoins, la facilité de mise en œuvre et la flexibilité de ce protocole a séduit de nombreuses équipes de recherche pour la fabrication de biocapteurs.

Zhu *et al* [122] ont ainsi greffé des anticorps anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10 et anti-TNF- α à des nanotiges d'or préalablement fonctionnalisés avec de l'acide 11-mercaptopundécanoïque (thiol). Pour cela ils ont utilisé des solutions d'EDC à 0.4M et de NHS à 0.6M en proportion 1 :1 dans du tampon MES. Une incubation de 30 minutes au sein du canal microfluidique contenant les nanotiges d'or permet d'activer la surface des nanotiges avant la conjugaison avec les solutions d'anticorps à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Une stratégie similaire a été adoptée par Bellagambi *et al* [44] pour la fonctionnalisation d'une surface d'or fonctionnalisée avec de la 4-carboxyméthylaniline. La conjugaison d'anticorps anti-TNF- α par EDC/NHS permet ensuite la détection électrochimique de TNF- α dans des échantillons de salive au travers d'un immunodosage en sandwich.

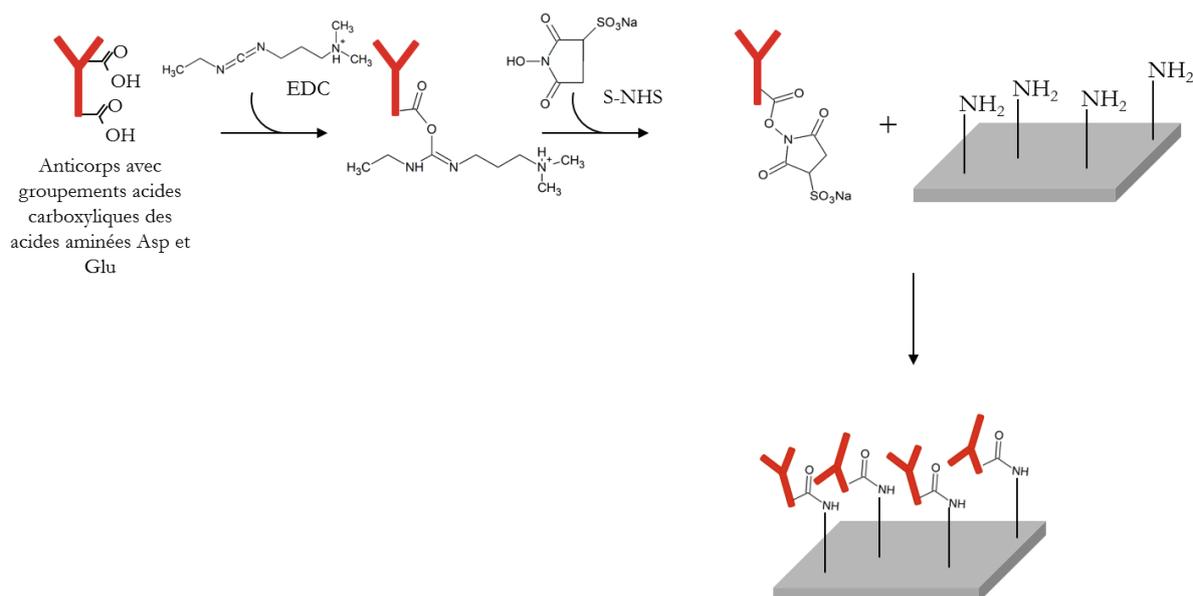


Figure 1 - 16. Bioconjugaison d'un anticorps avec une surface présentant des fonctions amines par activation EDC/S-NHS

Une chimie similaire est utilisée pour l'activation des groupements thiols des protéines par l'intermédiaire de maléimide. Le maléimide réagit avec les résidus cystéines des protéines pour former une liaison thioéther stable. Le maléimide est souvent lié au NHS [194,195].

Certaines stratégies reposent sur l'utilisation d'espaceurs (*spacers*) bifonctionnels. Une extrémité de l'espaceur est liée de façon covalente avec la surface et la protéine (anticorps) est liée à l'autre extrémité de l'espaceur. En fonction de la taille de cette molécule, elle peut conférer une certaine flexibilité spatiale aux anticorps immobilisés proche de la surface, minimisant le gêne stérique et favorisant la capture de l'antigène [160,170]. Parmi les espaceurs les plus utilisés se trouvent le polyéthylenglycol (PEG) et ses dérivés, les dendrimères [196,197], le dextrane [172] ou le glutaraldéhyde.

Jang *et al* [198] ont ainsi modifié une surface de PDMS en la silanisant avec du 7-octenyltri(chloro)silane, puis en oxydant les groupements terminaux vinyliques du silane pour former des groupements carboxyliques. Les groupes carboxyliques sont ensuite activés par EDC-NHS et conjugués avec un dérivé aminé du PEG, le biotin-LC-PEO-NH₂ (voir Figure 1 - 17). Des anticorps-avidine sont ensuite immobilisés par interaction biotin-avidine et un immunodosage en sandwich d'IgG de souris est réalisé avec un complexe anticorps-avidin/IgG de souris/anticorps anti-souris conjugués à l'alkaline phosphatase (ALP).

Le glutaraldéhyde permet de conjuguer deux amines entre elles. German *et al* [199] ont ainsi fabriqué un immunocapteur électrochimique de l'IL-6 en conjuguant à l'aide de glutaraldéhyde des anticorps anti-IL-6 à des billes de verre modifiées avec de l'APTES. Pour cela, les billes modifiées sont incubées dans une solution aqueuse à 5% de glutaraldéhyde à pH 10 pendant 2h à température ambiante. La conjugaison avec les anticorps est ensuite réalisée dans du PBS à 5°C pendant une nuit.

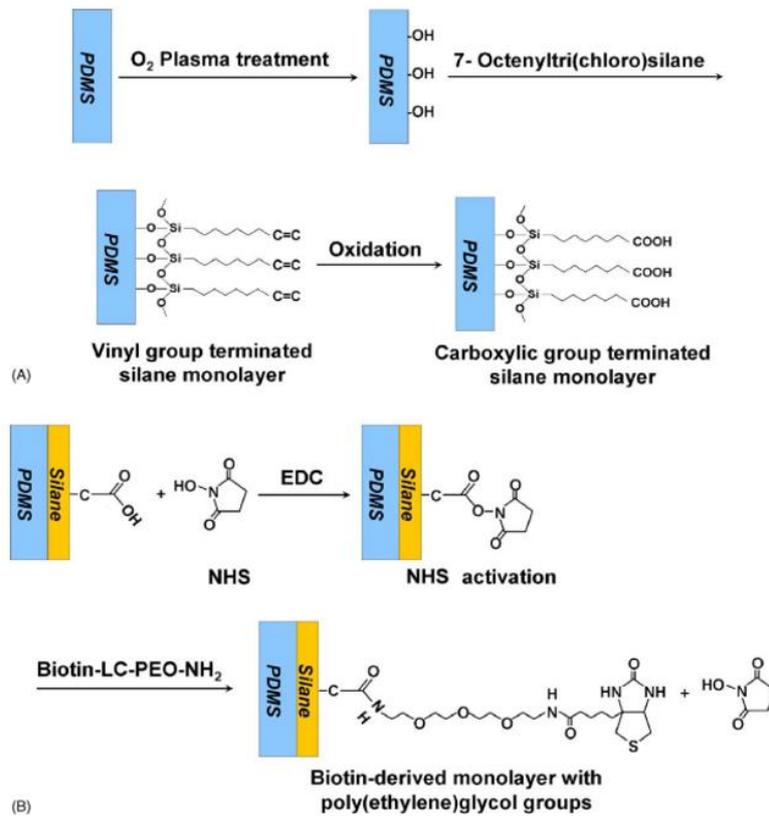


Figure 1 - 17. Modification du PDMS avec une monocouche de silane dérivé de la biotine par silanisation et PEGylation (adapté de [198])

D'autres méthodes plus complexes reposent généralement sur la modification des protéines avec des groupements particuliers (azides, alcynes, diènes), des protéines de fusion ou oxydées ; mais elles présentent un risque d'altération de la protéine et nécessitent des étapes de purification [163].

Ainsi, la conjugaison d'anticorps avec des surfaces fonctionnalisées peut être réalisée selon une variété de protocoles. La méthode retenue devra prendre en compte la nature de la liaison covalente à créer entre la surface et l'anticorps ainsi que les conditions réactionnelles.

Nous avons donc vu les différents composants d'un biocapteur, de la méthode de transduction et à la conception de la surface biosensible. Le choix du matériau constitutif nécessite de prendre en compte l'intégration microfluidique et la flexibilité du biocapteur portable. Certains matériaux polymériques répondent notamment à ces contraintes, en particulier le PDMS. Afin de rendre la surface du substrat biosensible, une étape de fonctionnalisation de surface est nécessaire. Parmi les différentes méthodes présentées, la silanisation semble être une stratégie adaptable à de nombreux substrats et capable de former des monocouches auto-assemblées sur la surface. La variété de silanes existant permet également d'offrir un vaste choix de groupements fonctionnels à disposition pour le greffage. Le greffage des anticorps à la surface des silanes repose alors sur la création d'une liaison covalente par l'intermédiaire de réactifs de bioconjugaison adaptés aux fonctions chimiques impliquées. La qualité de la biofonctionnalisation de surface est déterminante pour les performances du biocapteur. La surface biosensible obtenue pourra ensuite être appliquée à l'immunodosage des cytokines.

En vue de l'optimisation de l'étape d'immunodosage et notamment de capture de l'antigène, les nano et micro-objets constituent des supports idéaux pour faciliter les réactions, comme nous l'avons vu précédemment. En particulier, les billes magnétiques pouvant être manipulées en tube ou au sein d'une puce microfluidique ont révolutionné les analyses biochimiques. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'utilisation de ces billes en biochimie et à leur manipulation.

3. Billes magnétiques : contrôle et manipulation dans les dispositifs microfluidiques

Dans cette partie nous allons aborder l'utilisation des billes magnétiques comme support de capture par les anticorps au sein de dispositifs microfluidiques. Nous reviendrons en premier lieu sur quelques généralités sur la conception et l'utilisation des billes magnétiques en laboratoire avant de détailler davantage leur usage dans des laboratoires sur puce pour des applications en biologie. Enfin, nous présenterons différents dispositifs permettant de produire un champ magnétique afin de manipuler/capter les billes magnétiques au sein des laboratoires sur puce.

3.1. Généralités sur les billes magnétiques

3.1.1. Propriétés et structures des billes magnétiques

La première utilisation de billes magnétiques en laboratoire remonte à plus de 40 ans [200]. Depuis, les procédés de fabrication se sont améliorés afin de produire des billes sphériques uniformes de diamètres pouvant aller de 0.5 à 100 microns. Aujourd'hui, toutes les billes magnétiques commercialisées sont superparamagnétiques, c'est-à-dire qu'elles possèdent une magnétisation nulle en l'absence de champ magnétique mais sont facilement magnétisées lorsqu'un champ extérieur est appliqué. Cette propriété est essentielle pour pouvoir les manipuler facilement et éviter une agrégation non désirée du fait d'un champ magnétique rémanent au sein des billes.

Le choix de la taille des billes aura une influence sur leur surface spécifique. Généralement, des particules entre 500 nm et 2 μm sont utilisées pour offrir une surface spécifique importante et éviter un phénomène de sédimentation. Les billes abordent le plus souvent une structure cœur-coquille, c'est-à-dire qu'elles sont faites d'un cœur magnétique entouré d'un polymère non magnétique. Des nanoparticules d'oxydes de fer tels que la magnétite (Fe_3O_4) ou la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont souvent utilisées pour le noyau pour leur propriété superparamagnétique, leur faible coût de fabrication et leur grande stabilité [201]. Elles sont dispersées dans une matrice telle que du polystyrène, de la silice, du dextran ou de l'albumine. La coquille de polymère sert de revêtement fonctionnel et protège l'oxyde métallique du milieu extérieur. Il est alors possible d'introduire une variété de groupes fonctionnels en surface des billes : époxy, acide carboxylique, tosyl, streptavidine, ... (voir Figure 1 - 18).

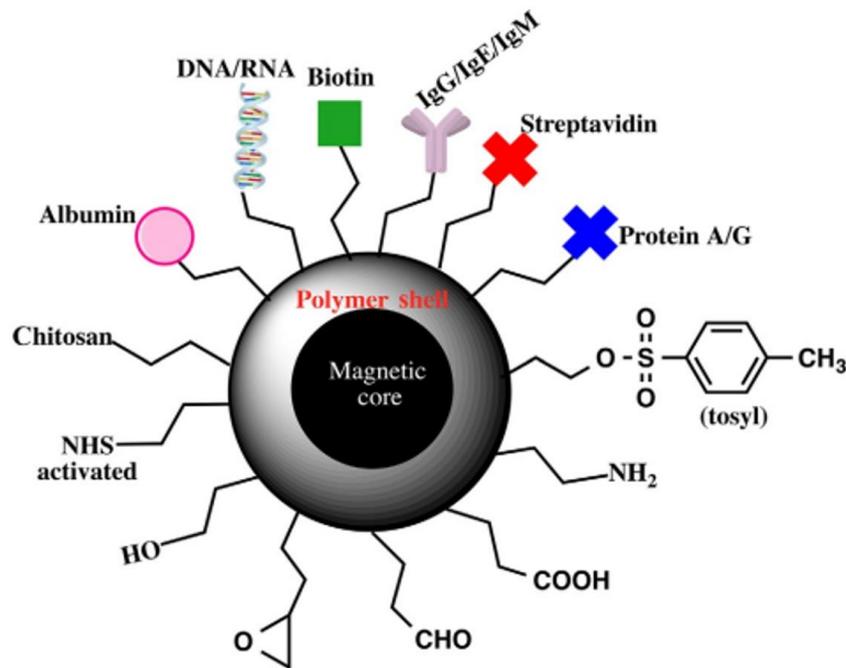


Figure 1 - 18. Les différentes fonctionnalités disponibles sur les billes magnétiques commerciales, des groupements chimiques aux biomolécules dotés de propriétés de reconnaissance spécifique (adapté de [202])

La conjugaison d'anticorps à la surface des billes peut avoir lieu par divers fonctions chimiques, à l'instar des réactions de bioconjugaison présentées dans la partie 2 de ce chapitre ou par les interactions de bioaffinité type streptavidine-biotine ou Protéine A/G. Ces protéines capturent spécifiquement les anticorps par leur fragment Fc (voir Chapitre 3). L'immobilisation de biomolécules comme les anticorps à la surface des billes a ouvert la voie à plusieurs applications en biologie, notamment dans la séparation et la préconcentration d'analytes.

3.1.2. Utilisation des billes magnétiques en tubes pour des analyses biochimiques

Traditionnellement, les étapes de préconcentration et de séparation en biochimie sont réalisées à l'aide de techniques de centrifugation ou de filtration. Ces étapes peuvent endommager les échantillons biologiques et nécessitent parfois de longs temps d'attente (ex : dialyse). La capacité des billes magnétiques à être facilement aimantées par un champ magnétique extérieur offre une alternative plus douce et plus rapide. Elles permettent de capturer l'espèce visée à leur surface puis elles sont séparées de la solution en appliquant un champ magnétique. Le reste de l'échantillon n'étant pas capturé par les billes, il pourra être retiré facilement. Les billes peuvent ensuite être dispersées dans un volume donné et préconcentrées avant d'éventuellement éluer les molécules capturées. Le principe général de cette approche est résumé dans la Figure 1 - 19. Il est donc possible d'appliquer cette étape de préconcentration à différentes cibles biologiques : cellules, bactéries, ADN, protéines, ...

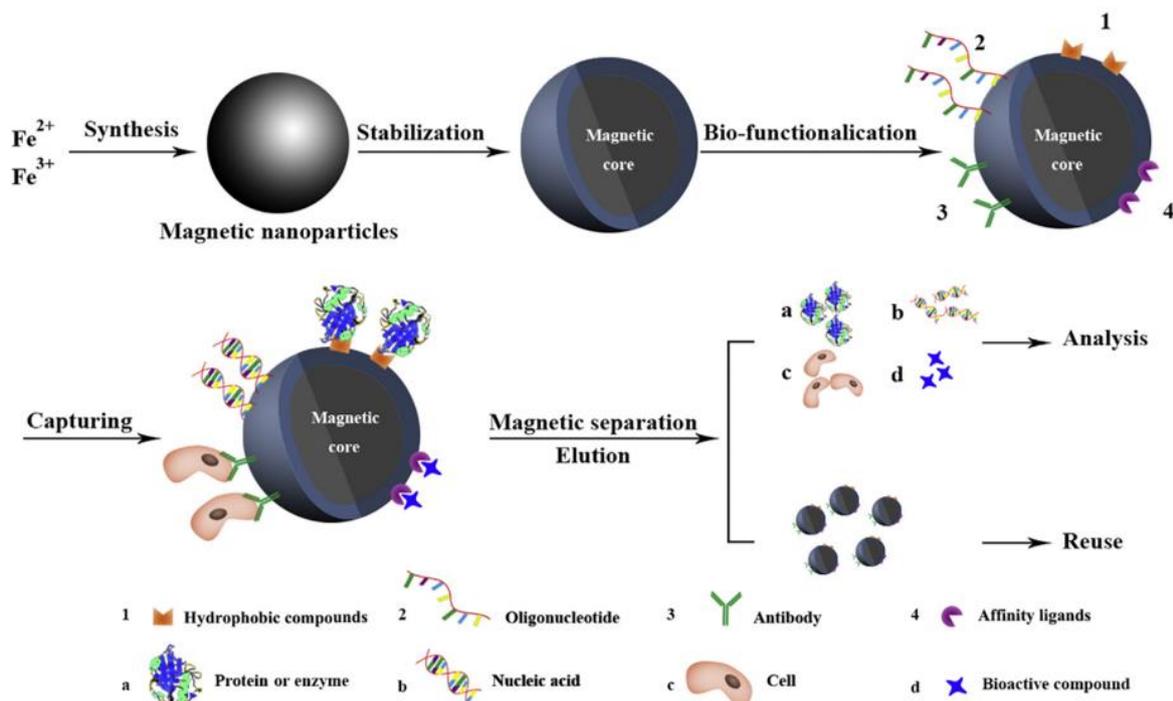


Figure 1- 19. Procédure générale de séparation magnétique dans la préparation d'échantillon en analyse biologique (adapté de [201])

Les billes magnétiques ont ainsi été beaucoup utilisées en protéomique pour la préconcentration de peptides et protéines afin d'étudier leur structure par des techniques analytiques (LC-MS, MALDI-MS, SERS...).

Fiedler *et al* [203] ont ainsi utilisé des billes magnétiques présentant des fonctionnalités de surface différentes (interactions hydrophobes, échanges de cations ou chromatographie d'affinités sur ions métalliques immobilisés) pour fractionner les peptides présents dans les urines avant analyse en MALDI-ToF. Les billes permettent ici d'éliminer les contaminations dans l'échantillon afin de ne garder que les peptides à analyser.

Zheng *et al* [204] ont synthétisé des billes magnétiques de Fe_3O_4 revêtues de polydopamine (voir partie 2.4) pour le greffage d'acide phénylboronique par chimie « click ». Ces billes ont ensuite été utilisées pour la préconcentration de glycoprotéines dans du sérum humain avant analyse par spectrométrie de masse des glycopeptides (voir Figure 1 - 20).

Mai *et al* [205] ont utilisé les billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps pour l'immunocapture de peptides β -amyloïde. Des billes Dynabeads de $2.8 \mu\text{m}$ recouvertes d'anticorps anti-IgG de souris ont été fonctionnalisées avec des anticorps monoclonaux anti- $\text{A}\beta$ avant d'être incubées pendant 15h à 4°C avec des échantillons de liquide céphalorachidien de patients atteints d'Alzheimer. Les peptides capturés ont ensuite été marqués sur les billes à l'aide d'un fluorophore (FP-488) avant d'être élués thermiquement en chauffant les billes à 95°C pendant 5 minutes. Les peptides marqués ainsi élués ont été analysés et quantifiés par CE-LIF. Ici, les billes ont permis à la fois de préconcentrer les peptides d'un facteur 100 et les marquer facilement en évitant un excès de fluorophore dans l'échantillon analysé.

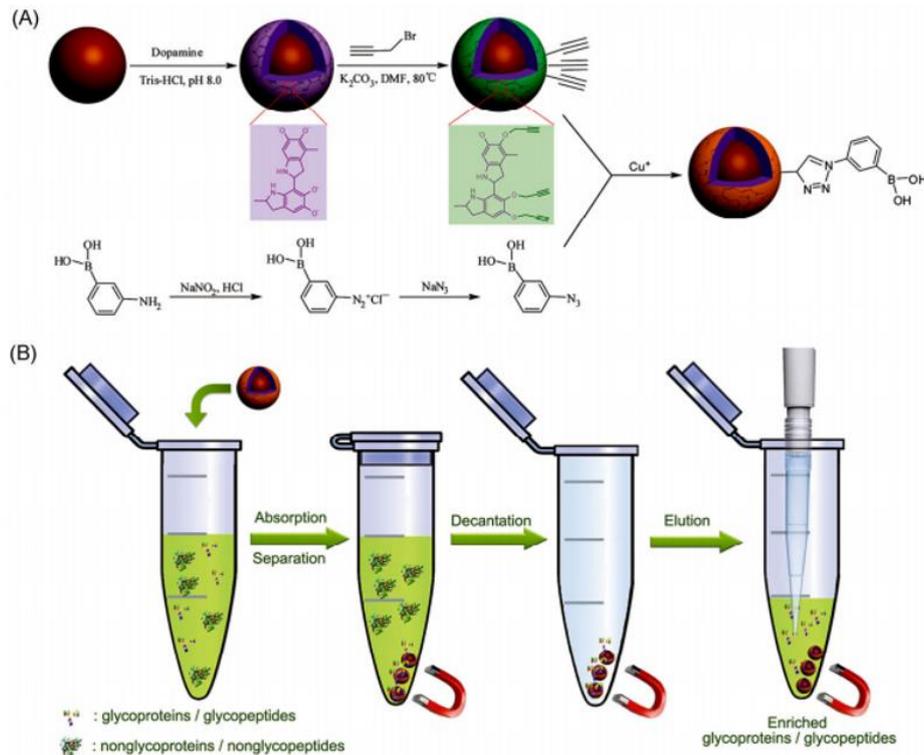


Figure 1 - 20. Illustration de la synthèse des billes magnétiques $\text{Fe}_3\text{O}_4@PDA-PBA$ par chimie « click » et procédure de préconcentration de glycoprotéines à l'aide des billes magnétiques (adapté de [204])

Oberacker *et al* [206] ont récemment proposé un protocole pour l'extraction et la purification d'ADN, ARN et plasmides à partir de lysats de cellules d'une variété de sources (bactérie, animal, végétal). Leur protocole implique également la synthèse des billes. Deux types de revêtement sont utilisés : silice et acide carboxylique, afin d'interagir avec les différents acides nucléiques visés. Les nucléotides extraits peuvent ensuite être analysés par PCR, spectrométrie de masse, etc. (voir Figure 1 - 21).

Ainsi, l'utilisation des billes magnétiques permet de simplifier et d'accélérer les protocoles de séparation et purification d'acides nucléiques, peptides et protéines.

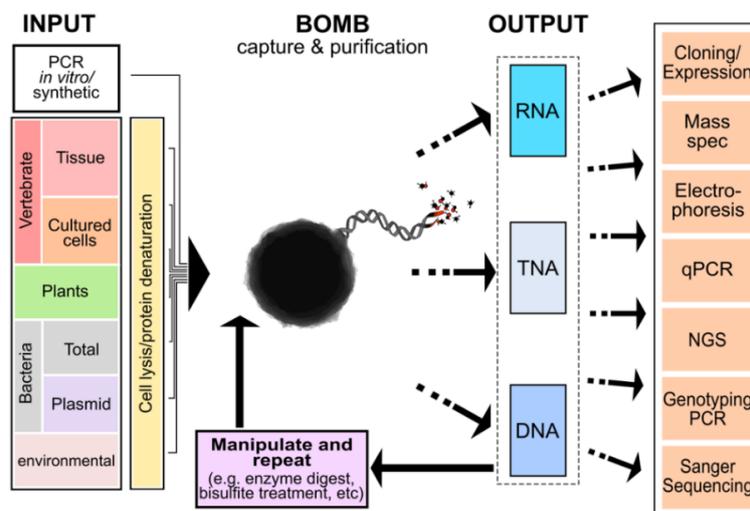


Figure 1 - 21. Plateforme de purification et analyse d'acides nucléiques proposé par Oberacker *et al* [206]

Les billes magnétiques fonctionnalisées sont également utilisées pour la séparation de cellules. Des billes biofonctionnalisées avec des anticorps sont mélangées avec une suspension de cellules. Puis la séparation magnétique des billes sous l'effet d'un champ extérieur permet de récupérer les cellules d'intérêts (sélection positive) ou d'éliminer les cellules non désirées (sélection négative). Comparée aux méthodes par filtration et séparation sur cartouche d'affinité, cette méthode est plus facile à mettre en œuvre, moins coûteuse et n'altère pas l'intégrité des cellules.

Song *et al* [207] ont développé des nanoparticules magnétiques fluorescentes couplées à l'avidine afin de greffer des anticorps monoclonaux de souris pour isoler et détecter différents types de cellules tumorales. Les anticorps sont immobilisés à l'aide d'IgG anti-souris biotinylés couplés aux nanoparticules. Des cellules leucémiques et de cancer de la prostate ont été détectées et isolées en 25 minutes à l'aide d'un microscope fluorescent sans aucun prétraitement. La combinaison de l'observation fluorescente et de la capture magnétique a permis ici de réaliser une analyse croisée de différentes cellules.

Par ailleurs, les billes magnétiques fonctionnalisées peuvent aussi être utilisées pour l'extraction de principes actifs dans des milieux complexes. Liu *et al* [208] ont ainsi pu extraire 13 isoflavones actives du Kudzu, une espèce de plante, à l'aide de billes magnétiques recouvertes de Bovine Serum Albumin (BSA). Ils ont d'abord synthétisé les billes fonctionnalisées avec des fonctions amines puis y ont greffé la BSA à l'aide de glutaraldéhyde. Les billes ont ensuite été incubées 2h avec l'extrait de plante et séparées avec un aimant. Après rinçage, les isoflavones isolées ont été éluées par du méthanol et analysées par LC-MS tandem.

Au-delà des étapes de prétraitement d'échantillons, les billes magnétiques peuvent également servir pour la quantification d'analytes comme support d'immunodosage.

Peng *et al* [209] ont ainsi synthétisé des nanoparticules magnétiques de Fe_3O_4 fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques pour le greffage d'anticorps anti-IL-6 par EDC/NHS. Les billes fonctionnalisées ont été incubées pendant 30 minutes à $37^\circ C$ avec les échantillons d'IL-6 pour l'immunocapture. Puis, des billes de CeO_2 fonctionnalisées avec l'anticorps de détection sont incubées avec l'immunocomplexe précédent pour former un immuno-sandwich magnétique entre les deux particules. La détection en colorimétrie repose sur l'ajout aux billes d'une solution d'o-phenylenedimamine (OPD). L'OPD est oxydée en oxOPD par les billes CeO_2 et l'absorbance de la solution est mesurée à 448 nm. Une limite de détection de 0.04 pg/mL a ainsi été obtenue pour l'IL-6 avec cet immunodosage magnétique par colorimétrie.

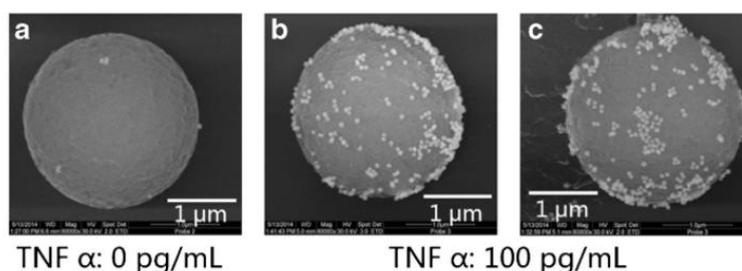


Figure 1 - 22. Images MEB des immunocomplexes billes magnétiques – TNF- α – nanoparticules d'or avec (a) 0 pg/mL et (b-c) 100 pg/mL de TNF- α (adapté de [125])

Lai *et al* [125] ont utilisé une stratégie similaire pour la quantification de TNF- α par détection SERS avec une limite de détection de 1 pg/mL. Des billes magnétiques fonctionnalisées avec un anticorps de capture anti-TNF- α servent de support pour l'immunocapture de la cytokine. La détection est ensuite assurée par des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps de détection immobilisées après silanisation et couplage des nanoparticules avec des protéines G. L'immunocomplexe formé (voir Figure 1 - 22) est ensuite quantifié par mesure SERS *via* les propriétés plasmoniques de nanoparticules d'or.

Finalement, les billes magnétiques offrent de multiples avantages pour la préparation d'échantillons en analyse biologique, que ce soit en termes de facilité d'utilisation, rapidité et coût, sans risque de dénaturation des échantillons. De plus, leur grande surface spécifique et leur facilité de manipulation en font des supports idéaux pour l'immunodosage de biomarqueurs. Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser entre autres à la miniaturisation de ces procédés au sein des laboratoires sur puce.

3.2. Utilisation des billes magnétiques pour les analyses biologiques intégrées aux laboratoires sur puce

L'intégration des particules magnétiques au sein des laboratoires sur puce et utilisant la microfluidique s'est rapidement imposée comme un outil indispensable à la conception de biocapteurs, microréacteurs et microsystèmes [210–214]. Les bénéfices de l'utilisation des billes présentées dans la partie précédente sont alors combinés aux avantages de la microfluidique : miniaturisation, temps de réaction réduit, faibles volumes d'échantillon, ... Les applications vont du transport de molécules et la manipulation sous champ magnétique, en passant par l'immunodosage et la détection assistée par les billes magnétiques.

3.2.1. Billes magnétiques : transport, tri et mélange de biomolécules dans les laboratoires sur puce

Nous avons vu que les propriétés superparamagnétiques des billes permettent de les manipuler aisément à l'aide d'un aimant ou d'un champ magnétique extérieur afin de les séparer du reste de la solution. Au sein des laboratoires sur puce, ces propriétés magnétiques peuvent être exploitées en association avec des designs microfluidiques variés pour permettre de mélanger des fluides, de transporter des molécules ou cellules et de les trier.

Ainsi, Owen *et al* [215] ont récemment développé un système de mélangeur microfluidique à l'aide de billes Dynabeads M-280 (2.8 μm de diamètre). Pour cela, un réseau de plot de Fe₂₀Ni₈₀ de 350 nm d'épaisseur est déposé sur un substrat de verre par évaporation sous vide du FeNi puis gravure sélective avec un masque de résine. Le FeNi est protégé de l'oxydation par un dépôt de silice de 150 nm en PE-CVD. Une puce de PDMS comprenant des canaux et des réservoirs pour les billes, est remplie avec de l'eau déionisée non fluorescente et de l'eau déionisée fluorescente (Fluospheres Yellow-Green 40 nm à 0.1%). Un aimant permanent en rotation est placé à proximité de la puce et permet de créer un champ magnétique rotatif modifiant la distribution des pôles magnétiques au sein de plots de FeNi. Les plots concentrent les lignes de champ extérieur en rotation et capturent ainsi les billes qui suivent la direction des pôles en tournant autour du plot.

Le mélange des deux liquides est suivi en microscopie à fluorescence. Un mélange efficace des liquides non fluorescent et fluorescent a été réalisé en moins de 10 secondes (voir Figure 1 - 23A). En fonctionnalisant la surface des billes, ce système permettrait également de capturer efficacement des espèces présentes dans le fluide en circulation.

L'intérêt d'un mélangeur en microfluidique est particulièrement intéressant car la plupart des systèmes microfluidiques reposent sur des flux laminaires à faible nombre de Reynolds. Aussi, le mélange de deux liquides ne se fait que par diffusion. Introduire un système actif de mélange permet ainsi d'accélérer les échanges entre les deux liquides et les espèces présentes pour optimiser les réactions.

Les billes peuvent aussi être utilisées pour trier et séparer des cellules au sein d'une puce microfluidique. Liu *et al* [216] ont développé un dispositif permettant de détecter et compter des cellules spécifiques au sein d'un échantillon comprenant plusieurs types de cellules. Pour cela, ils ont utilisé des billes magnétiques Dynabeads CD31 de 4.5 μm fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques d'un marqueur des cellules endothéliales CD31+. Le dispositif consiste en deux systèmes de comptage Coulter (compteur de cellules/particules par mesure de la résistivité d'un électrolyte entre deux bornes de tailles connues) séparés par une chambre fluïdique (voir Figure 1 - 23B). Un gradient de champ magnétique est appliqué dans la chambre *via* un aimant cylindrique extérieur. Les billes se fixent sur les cellules CD31+ dans l'échantillon. Du fait du gradient de champ magnétique, les cellules marquées avec les billes ont un temps de passage entre les deux systèmes Coulter légèrement modifié, ce qui n'est pas le cas pour les cellules non marquées. Le retard mesuré entre les deux systèmes de comptage permet d'identifier et de quantifier les cellules marquées. Leur taille peut aussi être calculée par le système Coulter. Ce système permet de facilement compter et trier des cellules au sein d'un échantillon de cellules hétérogène mais également de les caractériser *in situ* sans nécessité de marqueur fluorescent.

Song *et al* [217] ont récemment proposé un système basé sur un principe similaire pour trier et séparer deux populations de cellules. Des billes magnétiques sont orientées vers une des populations (lymphocytes T ou cellules cancéreuses) pour marquer spécifiquement un type de cellule au sein d'un échantillon de sang humain. A travers un design adapté de la puce microfluidique (voir Figure 1 - 23C), les autres sont capables de contrôler sous champ magnétique la trajectoire de la population de cellules marquées au sein du canal. Sous l'influence d'un champ magnétique extérieur, les cellules sont attirées vers la paroi opposée du canal tandis que les cellules non marquées continuent leur trajectoire du côté où elles ont été injectées. A l'extrémité du canal, plusieurs sorties sont possibles selon le trajet des cellules (marquées par les billes magnétiques ou non), permettant de discriminer les deux populations. Un système de comptage Coulter permet ensuite de détecter et compter les cellules déviées.

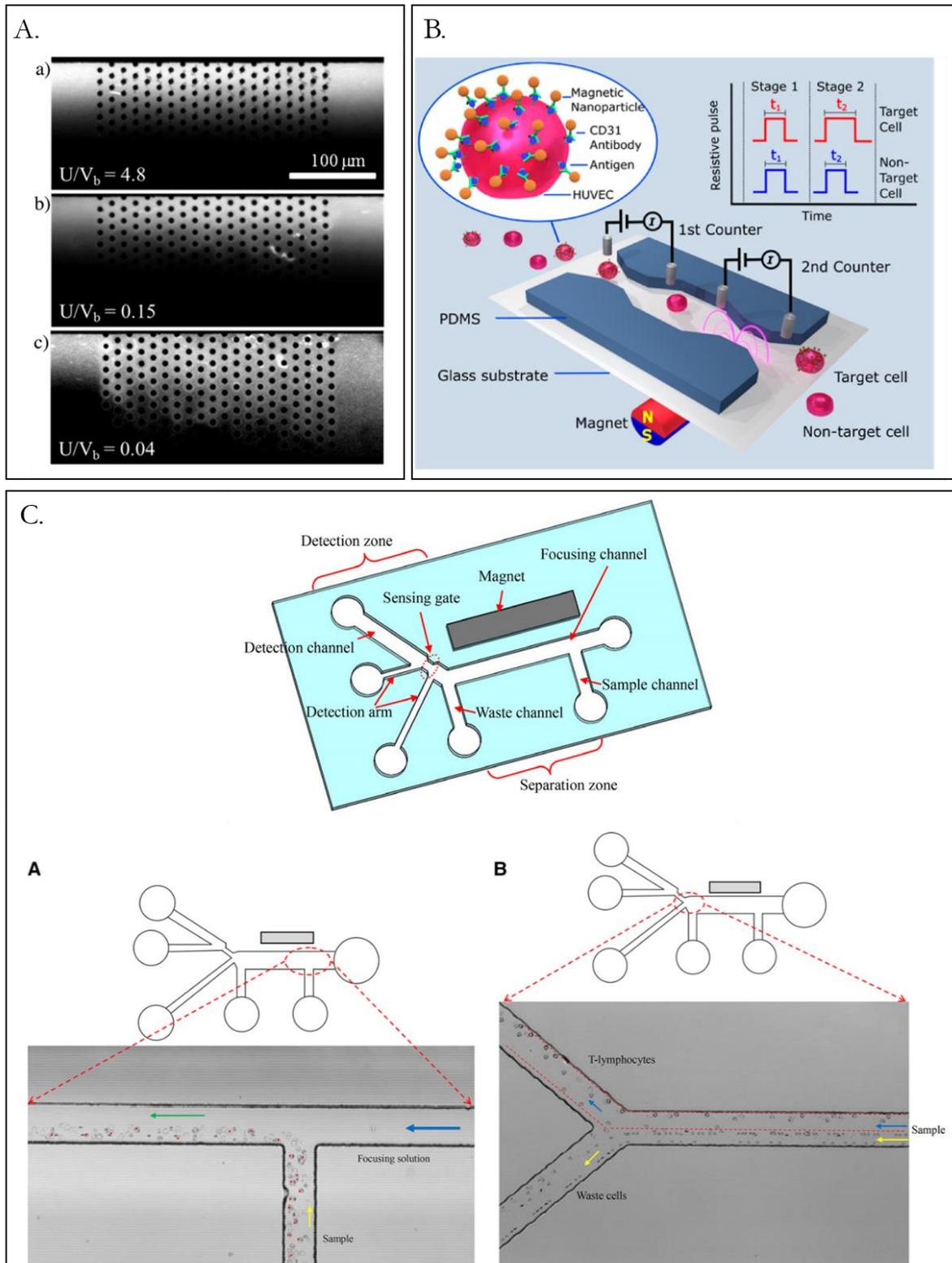


Figure 1- 23. A. Images de microscopie à fluorescence montrant le mélange de deux fluides à l'aide des billes magnétiques en rotation autour des plots de FeNi. Les vitesses du fluide U et des billes V_b ont été varié a) $U/V_b=4.8$, b) $U/V_b=0.15$, c) $U/V_b = 0.04$ (adapté de [215]). **B.** Système de comptage et tri de cellules basé sur le temps de transit entre deux compteurs Coulter. Les cellules marquées par les billes magnétiques sont retardées par le champ magnétique extérieur (adapté de [216]). **C.** Trajectoires des lymphocytes T et des autres cellules autour des deux virages dans les canaux : (A) à la jonction T du canal d'injection, (B) à jonction des zones de séparation et de détection (adapté de [217]).

3.2.2. Billes magnétiques : immunodosage dans les laboratoires sur puce

Au-delà de la manipulation d'espèces au sein d'une puce, les billes magnétiques peuvent aussi servir de support pour des réactions d'immunodosage ou servir de signal pour la détection d'immunocomplexes immobilisés à leur surface.

Otieno *et al* [218] ont ainsi développé une plateforme d'immunodosage sur billes magnétiques pour la quantification d'IL-6 et IL-8. La plateforme est constituée d'une chambre de capture en PDMS/PMMA avec un barreau aimanté et d'une chambre de détection comprenant une électrode de carbone recouverte de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps primaires anti-IL. Des billes magnétiques Dynabeads Streptavidine sont couplées à des anticorps secondaires anti-IL biotinylés et de la HRP. Les billes sont injectées dans la chambre de capture et bloquées à l'aide d'un aimant. Elles sont incubées avec l'échantillon et maintenues en agitation par le barreau aimanté en rotation. A la fin de l'incubation, l'aimant est retiré pour libérer les billes greffées qui sont envoyées vers la chambre de détection. Un immunocomplexe se forme alors à la surface des électrodes puis une solution d'hydroquinone et de H_2O_2 est injectée pour mesurer la quantité de complexes immobilisés par ampérométrie en 30 minutes (voir Figure 1 - 24A). L'équipe a ainsi pu valider l'utilisation de sa plateforme pour une analyse multiplexe de l'IL-6 et l'IL-8 dans du sérum avec des limites de détection de 5 et 7 fg/mL respectivement. Dans cet exemple, la sensibilité de la détection ampérométrique est couplée aux avantages de la microfluidique et de la manipulation magnétique des billes comme support des réactions d'immunodosage.

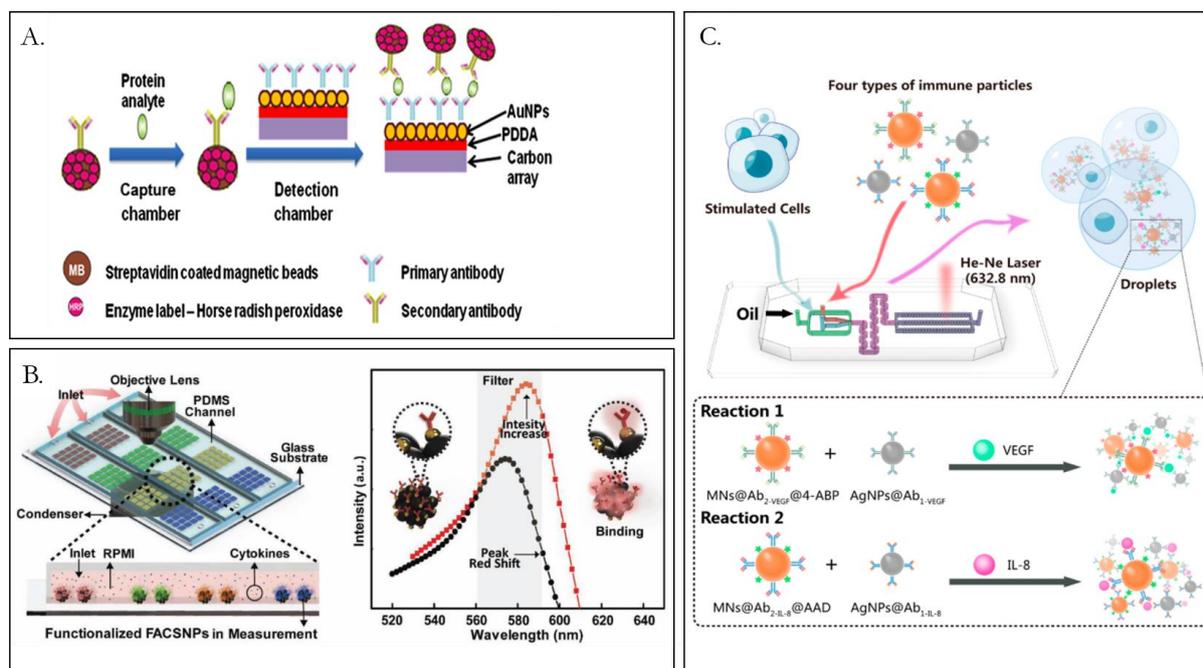


Figure 1- 24. **A.** Principe de la détection ampérométrique des immunocomplexes magnétiques. Capture des analytes sous flux sur billes greffées avec anticorps et HRP puis détection ampérométrique des immunocomplexes (adapté de [218]). **B.** Microréseau de nanoparticules hybrides Fe_3O_4/Au cœur-coquille (FACSNP) pour détection multiplexe de cytokines par LSPR (adapté de [219]). **C.** Principe du dispositif microfluidique sur gouttes pour encapsulation de cellule unique et détection SERS du VEGF et de l'IL-8 (adapté de [220]).

Cai *et al* [219] ont récemment proposé un dispositif de détection de cytokine par LSPR à partir de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées et déposées en réseau au sein d'une puce microfluidique. Pour cela, ils ont d'abord synthétisé des nanoparticules hybrides $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ cœur-coquille afin de bénéficier à la fois des propriétés superparamagnétiques des nanoparticules de Fe_3O_4 et des propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or pour la détection LSPR. Ces nanoparticules sont ensuite déposées et structurées sous forme de microréseau à l'aide d'un tampon de PDMS et d'un aimant sur un substrat de verre traités avec un alcane thiolé. Les nanoparticules sont ensuite fonctionnalisées avec les anticorps anti-cytokines après leur dépôt sur le substrat de verre. L'ensemble est placé dans des canaux de PDMS et les solutions de cytokines sont injectées pour être capturées par les nanoparticules immobilisées (voir Figure 1 - 24B). Ce dispositif a ainsi permis la quantification de 4 cytokines (IL-6, MCP-1, TNF- α , TGF- β) en multiplexe avec des limites de détection de l'ordre de 20 pg/mL.

Sun *et al* [220] ont développé une plateforme de quantification de cytokines sécrétées par une cellule unique à l'aide d'une détection SERS assistées par des billes magnétiques au sein de microgouttes encapsulant chacune une unique cellule cancéreuse. Les cellules cancéreuses sont d'abord encapsulées dans des microgouttes à l'aide d'une puce microfluidique avec un injecteur en T et une émulsion eau dans huile [221]. Deux lots de nanoparticules d'argent sont fonctionnalisés avec des anticorps monoclonaux anti-VEGF et anti-IL-8 (AgNPs@Ab1) respectivement. Deux lots de billes magnétiques sont fonctionnalisés avec des anticorps polyclonaux anti-VEGF et anti-IL-8 (MNs@Ab2) respectivement. Les deux lots de billes magnétiques sont modifiés avec des marqueurs Raman, le 4-aminobiphenyl (4-ABP) et acétamide (AAD) pour les deux biomarqueurs respectifs. Les deux populations de billes injectées dans la puce microfluidique sont alors au contact des cellules tumorales. Un immunocomplexe composé des deux types de particules se forment alors et la rencontre des AgNPs@Ab1 avec les marqueurs Raman permet d'activer la détection exaltée. Les auteurs notent également que le champ magnétique issu des billes augmente également le signal Raman ; ce qui améliore la sensibilité de la détection. Le signal est mesuré par un spectrophotomètre (voir Figure 1 - 24C). Le dispositif a alors permis de réaliser une quantification simultanée des deux types de cytokines pour plusieurs types de cellules avec une limite de détection de 1.0 fg/mL. Dans cet exemple, les billes magnétiques ont servi à la fois de support de capture mais également comme amplificateur du signal de détection.

Par ailleurs, Feng *et al* [222] ont utilisé les propriétés magnétiques des billes pour réaliser un immunodosage du Prostate Specific Antigen (PSA), un biomarqueur tumoral, avec une détection magnétique par Giant MagnetoImpedance (GMI). Ils ont fabriqué pour cela une puce microfluidique contenant une chambre d'incubation et une chambre de détection. Des billes magnétiques Dynabeads MyOne Streptavidin sont conjuguées avec des anticorps biotinylés anti-PSA puis injectées dans la puce pour la capture du PSA au sein d'une structure en serpent in pour assurer un mélange efficace (voir Figure 1 - 25). Après 20 minutes, les billes conjuguées avec le PSA sont acheminées dans la chambre de détection où elles sont immobilisées avec un aimant permanent. Dans la chambre de détection, une surface d'or de 200 nm a été déposée sur du polyimide par pulvérisation cathodique avant scellage de la puce avec les canaux de PDMS. La surface d'or est traitée avec de l'acide 3-mercaptopropionique, afin de former une monocouche autoassemblée composée de groupements carboxyliques. La puce est ensuite scellée et des anticorps anti-PSA sont greffés à la surface d'or par conjugaison EDC/NHS. Ainsi, lorsque les

billes conjuguées sont injectées dans la chambre de détection, un immunocomplexe se forme entre les billes et la surface en présence de l'antigène. Les billes non conjuguées sont évacuées par rinçage de la puce. La présence des billes magnétiques immobilisées sur la surface entraîne une variation locale du champ magnétique qui peut être mesurée par le capteur GMI. La détection est assurée en moins de 40 minutes et permet d'atteindre une limite de détection de 0.1 ng/mL. Les auteurs notent que la proximité des billes avec la surface du capteur est une clé de la sensibilité de la détection.

En effet, comme nous le verrons dans la partie suivante, la miniaturisation des systèmes magnétiques au sein des puces permet d'améliorer la sensibilité de la manipulation/détection des objets magnétiques. Cependant, Feng *et al* notent également que la répétabilité et le recyclage de ce type de puce restent encore à améliorer, notamment du fait des variations possibles dans la sensibilité des capteurs GMI en fonction de la qualité de fabrication. Néanmoins, dans cet exemple, les billes permettent à la fois d'améliorer la capture de l'antigène, d'accélérer et de simplifier les étapes du dosage mais également de servir de marqueur magnétique pour la quantification ; ce qui évite les interférences dues au substrat observées en fluorescence par exemple.

Finalement, ces différents exemples montrent la versatilité des applications des billes magnétiques dans les immunodosages sur puce pour différents systèmes de détection : électrochimique, optique (plasmonique) et magnétique. L'utilisation d'aimants permanents au sein de ces dispositifs pour la manipulation des billes magnétiques constitue une des stratégies les plus utilisées à ce jour en raison de sa facilité. Cependant, nous allons voir dans la partie suivante qu'il existe d'autres systèmes de manipulation, avec des avantages notables pour les dispositifs miniaturisés.

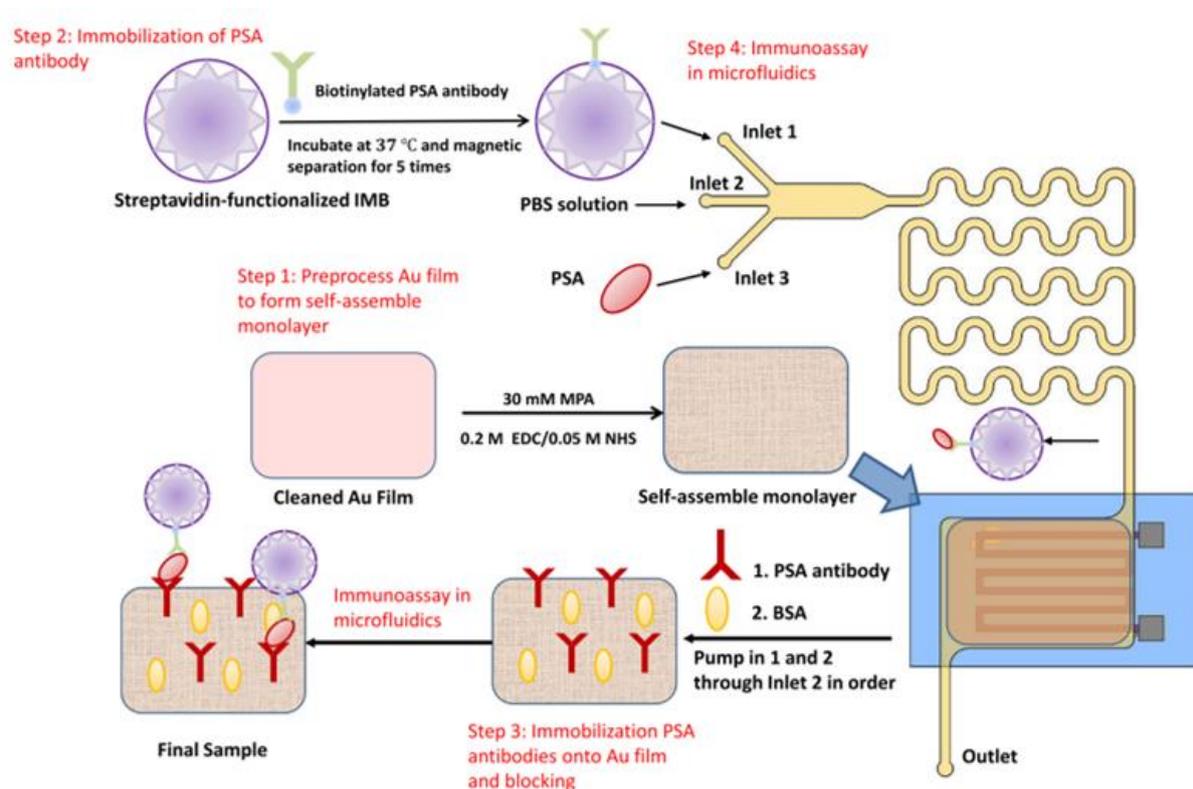


Figure 1 - 25. Principe de l'immunodosage magnétique du PSA au sein d'une puce microfluidique intégrant un capteur GMI (adapté de [222]).

3.3. Fabrication de dispositifs de capture et de manipulation de billes magnétiques en microfluidique

Après avoir vu les bénéfices de l'utilisation des billes magnétiques comme support d'immobilisation des anticorps dans les immunodosages en microfluidique, nous allons nous intéresser à la manipulation et la capture (magnétophorèse) des billes au sein des laboratoires sur puce. Les propriétés magnétiques des billes peuvent être exploitées pour les contrôler à l'aide d'un champ magnétique. Deux approches différentes peuvent être utilisées pour le générer : les aimants permanents et les électro-aimants.

3.3.1. Aimants permanents pour la manipulation/capture des billes magnétiques

L'utilisation d'aimant permanent pour la manipulation/capture de billes magnétiques au sein d'une puce microfluidique reste l'approche la plus simple et la moins coûteuse à mettre en place. Pour cela, un aimant est utilisé pour générer un champ allant de la centaine de mT à environ 1T. Il est généralement constitué d'au moins un des éléments magnétiques suivants : cobalt (Co), fer (Fe) et/ou nickel (Ni). D'autres éléments non magnétiques peuvent être également intégrés comme l'aluminium, ou le Néodyme/Bore (les aimants NdFeB figurent parmi les plus courants).

Cependant, ces structures sont difficiles à miniaturiser car généralement issues de matériaux macroscopiques et donc difficilement intégrables au sein d'une puce microfluidique. Ils sont donc souvent appliqués à l'extérieur du système, générant un champ puissant mais peu localisé, pouvant provoquer l'agrégation des billes magnétiques en une zone du canal microfluidique [223,224]. Seul le déplacement physique de l'aimant peut permettre le déplacement des billes au sein du canal.

Pour éviter ces phénomènes d'agrégation, Huang *et al* [225] ont modifié la géométrie du canal en intégrant des micropuits sur les parois à proximité d'un aimant NdFeB. Les billes magnétiques sont ainsi séparées au sein des puits de dimensions voisines et l'agrégation est évitée. En revanche, seule la capture est assurée et la manipulation des billes au sein du canal n'est pas démontrée.

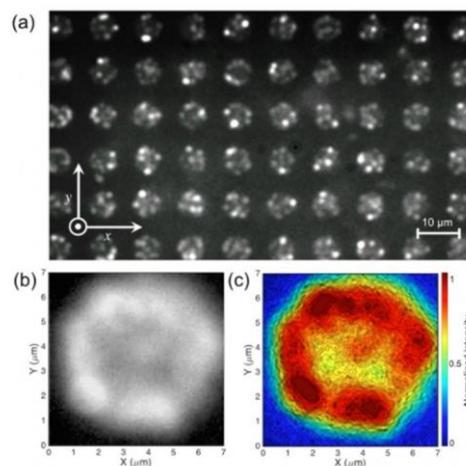


Figure 1- 26. Analyse d'image quantitative de la distribution des billes magnétiques sur la surface de disques de Co/Ni : (a) Image de microscopie à fluorescence de la capture des billes sur les disques de 7 μm de Co/Ni. (b) Intensité fluorescente d'une superposition d'images de disques Co/Ni. (c) Intensité normalisée de la superposition d'images montrant les zones de capture magnétique sur le périmètre des disques de Co/Ni (adapté de [226])

D'autres travaux ont néanmoins porté sur la microstructuration d'aimants permanents afin de faciliter leur intégration au sein de systèmes microfluidiques pour la formation d'un champ magnétique statique localisé. Pour cela, les matériaux magnétiques peuvent être déposés par dépôt électrolytique, pulvérisation cathodique ou évaporation sous vide. Hsiao *et al* [226] ont ainsi développé un quadrillage de disques de 4 à 7 μm de diamètre composés d'une multicouche de cobalt (0.2 nm)/ nickel (0.4 nm) déposée par évaporation sous vide. Cette structure a été intégrée au sein d'un canal microfluidique et des billes magnétiques fluorescentes ont été injectées et capturées par les disques magnétiques (voir Figure 1 - 26).

Il est aussi possible de déposer des matériaux magnétiques « doux », c'est-à-dire ne présentant pas d'aimantation mais étant facilement magnétisable par l'application d'un champ magnétique externe. Ces structures de matériaux magnétiques peuvent être intégrées dans la puce microfluidique et aimantées quand cela est nécessaire par un aimant extérieur. Royet *et al* [227] ont ainsi intégré des bandes de matériaux magnétiques doux (fer carbonyle) et dur (NdFeB) sous forme de polymères magnétiques composites en les injectant dans des moules de PDMS. Ces structures magnétiques sont ensuite facilement intégrées au sein d'un canal (voir Figure 1 - 27A). Ces bandes sont ensuite placées en travers du canal afin de servir de système de tri de cellules marquées ou non avec particules magnétiques *via* la force exercée par le flux de liquide par rapport à l'attraction des bandes magnétiques. Les structures en NdFeB (matériau magnétique dur) sont alors comparées aux structures en fer carbonyle (matériau magnétique mou) dont l'intensité du champ est modulable par l'application du champ magnétique externe *via* un aimant permanent NdFeB appliqué à proximité. Ces deux structures se sont montrées efficaces pour le tri des particules magnétiques.

Van Pelt *et al* [228] ont utilisé un concept similaire en moulant des structures magnétiques de fer carbonyle en forme de « champignon » dans du PDMS (voir Figure 1 - 27B). Cette structure est ensuite intégrée au sein d'une puce microfluidique et un champ magnétique externe en rotation est appliqué. Ce champ rotatif ainsi que la géométrie particulière des structures magnétiques intégrées dans la puce créent des zones de maxima magnétiques variables le long de la puce. Les billes magnétiques injectées sont alors déplacées le long de ces maxima, à la manière d'un « tapis roulant » magnétique.

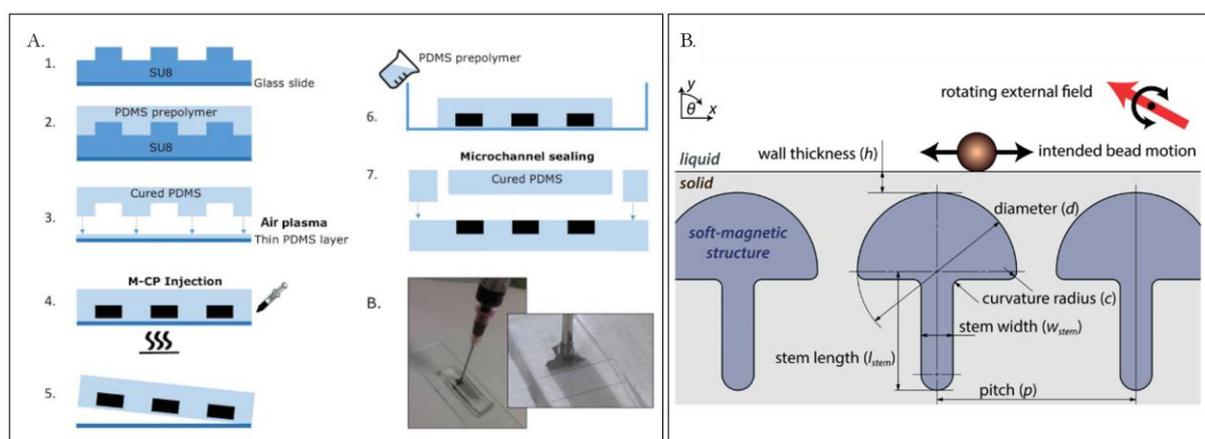


Figure 1 - 27. A. Schéma de fabrication des bandes magnétiques moulées dans du PDMS et intégration de la structure au sein d'une puce microfluidique (adapté de [227]). **B.** Schéma du « tapis roulant » magnétique pour la manipulation de billes magnétiques au sein d'un canal microfluidique soumis à un champ magnétique en rotation (adapté de [228])

Néanmoins, le principal défaut des aimants permanents, qu'ils soient externes ou intégrés à la puce microfluidique, est l'impossibilité de produire un champ magnétique modulable pour améliorer la manipulation/capture des objets magnétiques. Par ailleurs, bien que certaines géométries permettent de générer des gradients de champs, leur structuration reste compliquée. L'utilisation d'électroaimants permet notamment de générer des gradients de champ magnétique importants, facilitant la manipulation des billes magnétiques au niveau local.

3.3.2. **Électroaimants pour la manipulation/capture des billes magnétiques**

Les électroaimants sont composés d'une bobine (fil enroulé) avec ou sans cœur magnétique (matériau magnétique doux). Ils permettent de produire des gradients de champ magnétique importants pour des géométries particulières (bobines planes), peuvent être facilement activés/désactivés sur des temps courts. Cependant, l'intensité du champ produit est plus faible que les aimants permanents et dépend surtout de la distance de la bille à l'aimant. Les intensités de champ produits vont de quelques mT à la centaine de mT.

L'intensité du champ produit étant proportionnelle à la densité de courant injectée dans la bobine, la structure peut rapidement s'échauffer du fait des pertes énergétiques par effet Joule. Cet échauffement doit être contrôlé afin d'éviter une détérioration du système et une altération des phénomènes fluidiques et biologiques, le cas échéant, au sein du canal. Hosseini *et al* [229] ont notamment étudié l'influence de l'échauffement du canal sur les prévisions des vitesses des particules magnétiques afin d'en optimiser la capture. La conception d'électroaimants pour la capture de billes magnétiques nécessite donc un compromis entre la densité de flux magnétique générée, la consommation énergétique de la bobine et l'échauffement par effet Joule.

Plusieurs géométries d'électroaimants ont été proposées au cours des années (plane, spiral, 3D...) afin d'optimiser l'intensité de champ produit et minimiser l'échauffement. L'intégration d'un cœur magnétique permet de concentrer les lignes de champ pour augmenter l'intensité du champ magnétique et le gradient de champ pour un même courant [230], et donc d'améliorer les performances de la bobine à des courants plus faibles. De même, des systèmes de refroidissement ont été proposés afin de réduire l'échauffement des électroaimants (canal de refroidissement [231], module Peltier) [232].

Récemment, l'équipe de Zhou *et al* a notamment développé plusieurs systèmes d'électroaimants pour la capture/manipulation de billes magnétiques de 2.8 μm comme des microbobines associées à des systèmes de détection par magnéto-impédance géante (GMI) [233] et flux-gate [234].

Le premier modèle de microbobines développé et présenté sur la Figure 1 - 28A se compose uniquement d'un solénoïde de cuivre avec des connectiques isolées électriquement par une couche de polyimide [233]. Une couche d'accroche de Cr/Cu est pulvérisée sur le substrat. Un masque de résine photosensible est déposé pour la structuration des motifs des sous-pistes et connectiques. Ces motifs sont ensuite déposés par dépôt électrolytique de cuivre. Un second moule de résine est déposé pour la croissance électrolytique des connectiques uniquement. La résine est ensuite retirée, la couche d'accroche gravée par Reactive Ion Etching (RIE) et l'ensemble est isolé par une couche de polyimide. Le polyimide est ensuite poli afin de laisser les connectiques apparentes. Une autre couche d'accroche de Cr/Cu est déposée sur le polyimide et le motif du solénoïde est déposé par photolithographie. La bobine est alors obtenue par dépôt électrolytique de cuivre. L'ensemble est protégé par une couche de polyimide et rattaché au système de détection flux-gate et au circuit

microfluidique en PDMS. Les auteurs ont notamment déterminé le taux de capture de billes par les bobines en comptant les billes grâce à un hémocytomètre. L'étude du taux de capture en fonction du débit fluïdique et du courant injecté montre que (i) le taux de capture diminue avec le débit car la force fluïdique finit par dépasser la force d'attraction magnétique de la bobine ; (ii) en augmentant le courant, le taux de capture double de 100 à 600 mA mais finit par saturer du fait de l'échauffement de la bobine par effet Joule, occasionnant une vibration des billes en solution. L'étude menée dans le chapitre 4 semble aboutir à des conclusions similaires, bien que le design des bobines et la taille de billes soient différentes.

Dans leur second capteur, Zhou *et al* associe un système de détection de billes magnétiques basé sur un capteur GMI et un système de capture à l'aide de microbobines fabriquées selon le même procédé général de fabrication que précédemment [234] (voir Figure 1 - 28B). Cependant, ils ont intégré un cœur magnétique en FeNi afin d'améliorer l'efficacité de la capture : la force exercée par la microbobine sur des billes situées à 5 μm au-dessus la bobine est 28.62 pN pour la bobine seule contre 43.78 pN pour la bobine avec FeNi. L'efficacité de capture des billes magnétiques a été évaluée à 96% à un débit de 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un courant de 300 mA injecté dans la bobine, sans dégagement notable de chaleur. La majorité des billes est capturée au niveau du plot central de FeNi, là où les lignes de champs magnétiques sont concentrées. Aussi, par rapport à leur étude précédente, l'ajout du plot de FeNi a permis de diminuer l'intensité de courant injectée : 80% de capture à 600 mA à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ précédemment contre 96% à 300 mA à 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ici. La diminution du débit fluïdique a aussi contribué à améliorer l'efficacité de capture. Aucun échauffement de la bobine a été observé, bien que les auteurs ne précisent pas si un relevé de la température a été effectué dans les deux études.

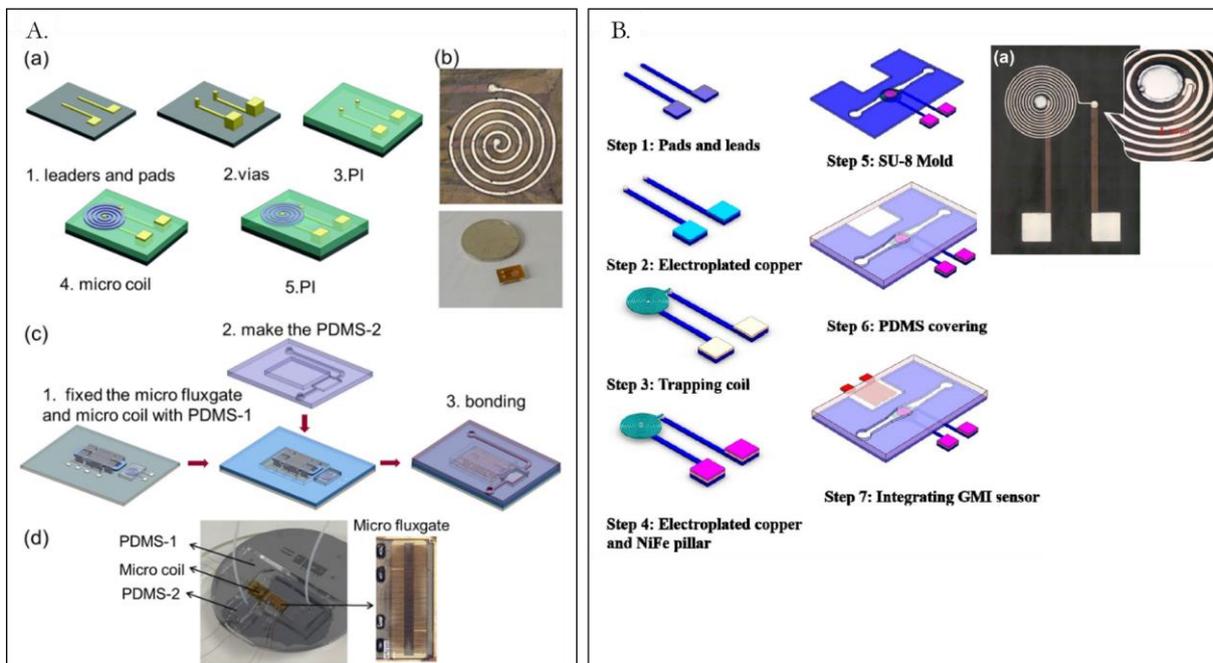


Figure 1 - 28. A. (a) Procédé de fabrication de la microbobine de capture ; (b) Image de la microbobine fabriquée ; (c) Procédé de fabrication du système microfluidique ; (d) Système final intégrant la microbobine de détection et le capteur flux-gate (adapté de [233]) ; **B.** Procédé de fabrication de la microbobine de capture avec plot central en FeNi et images du système de manipulation (adapté de [234])

L'équipe de Zhou *et al* a par la suite réalisé une microbobine 3D avec une pince magnétique en FeNi et des fils de FeNi pour le tri de billes magnétiques [235] (voir Figure 1 - 29). Le procédé de fabrication s'inspire des travaux précédents. Une couche d'accroche en Cr/Cu est déposée à une épaisseur de 150 nm sur un substrat de verre. Une couche de 25 μm de résine photosensible est déposée et structurée par photolithographie UV pour les motifs du premier segment des bobines et des connectiques. L'ensemble est déposé par dépôt électrolytique de cuivre. Le même procédé est utilisé pour la croissance des connectiques. La résine est retirée dans l'acétone et la couche d'accroche gravée par RIE. Une couche de polyimide est déposée pour isoler le premier segment et polie pour laisser les connectiques apparentes. Une autre couche d'accroche de Cr/Cu (150 nm) est déposée et les structures de FeNi sont déposées par dépôt électrolytique à une épaisseur de 30 μm . Les connectiques sont à nouveau déposées par micromoulage du cuivre et l'ensemble est isolé sous une couche de polyimide. Le segment supérieur des bobines est également micromoulé. L'ensemble est ensuite recouvert d'une couche de 80 μm de SU8 (SU-8 3050, Microchem) et le canal est fabriqué par lithographie UV. La puce est refermée par un capot de PDMS collé par plasma. Ce système a alors permis le tri de billes magnétiques de 2.8 μm (Dynabeads M-280 Streptavidin) avec une efficacité de 92.5% à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un courant de 200 mA parcourant la bobine. Au-delà, l'efficacité diminue par échauffement du système. Ce dispositif a enfin été appliqué au tri de bactéries *E. coli* attachée aux billes magnétiques

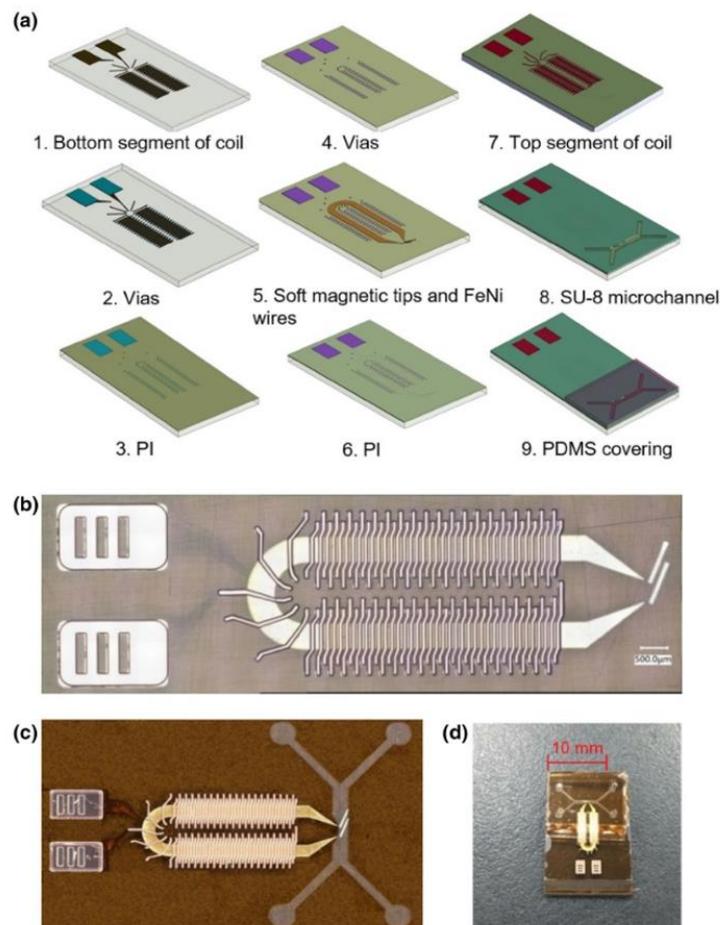


Figure 1 - 29. (a) Procédé de fabrication du séparateur magnétique ; (b) La microbobine 3D fabriquée et la pince et les fils de FeNi ; (c) Le canal de SU8 fabriqué de 500 μm de large ; (d) Système microfluidique complet (adapté de [235])

Ainsi, dans la perspective de l'intégration d'un système de manipulation/capture des billes magnétiques au sein du dispositif fluidique visé par cette thèse, les électroaimants semblent offrir le plus de contrôle sur la géométrie du système ainsi que l'obtention d'un champ magnétique très localisé. Les aimants permanents semblent plus adaptés au tri ou à la capture sans élution des billes magnétiques. Dans le dispositif visé dans cette thèse, les billes magnétiques doivent pouvoir être capturées, mélangées et déplacées en vue d'un greffage optimisé. L'élaboration d'un système à partir de microbobines semble donc offrir la précision et la flexibilité requises. Par ailleurs, l'expertise de fabrication de microbobines planaires au sein du département Microsystèmes et Nanobiofluidiques du C2N a orienté notre choix vers la conception de microbobines de cuivre pour la capture des billes magnétiques fonctionnalisées, comme cela sera détaillé dans le chapitre 4.

Conclusion du chapitre 1

Pour résumer, dans ce chapitre nous avons d'abord présenter l'intérêt de mesurer les variations des niveaux de cytokines chez l'homme dans l'objectif de suivre l'évolution des pathologies inflammatoires. Parmi ces cytokines, nous nous sommes intéressés au TNF- α comme cytokine modèle, présente dans de nombreux fluides biologiques dont la sueur. La sueur permet notamment d'assurer un prélèvement en continu tout en minimisant l'inconfort du patient.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux techniques de laboratoire permettant actuellement de quantifier avec suffisamment de sensibilité et de spécificité les cytokines au sein d'échantillons biologiques. Que ce soit en termes de temps de réaction, volume d'échantillon, encombrement et coût, ces techniques ne permettent pas d'assurer un suivi en temps réel des niveaux cytokiniques. La miniaturisation de ces tests et notamment l'usage de la microfluidique pourrait résoudre certaines de ces problématiques.

Par ailleurs, amener ces technologies au plus près de la peau et assurer le prélèvement de sueur permettrait un suivi en temps réel des protéines inflammatoires. Dans cette optique, les biocapteurs flexibles de type patch se placent comme des technologies de choix. Nous avons alors défini le concept de biocapteur ainsi que les différents composants. Le choix de la méthode de transduction ainsi que le matériau pour la conception d'un immunocapteur flexible microfluidique ont été discutés. Le PDMS apparaît alors comme un matériau polyvalent répondant aux différents critères imposés par la conception du capteur. Par ailleurs, la nécessité de fonctionnaliser le matériau afin de greffer les biorécepteurs nécessaires à la détection des cytokines a été abordée et différentes techniques de fonctionnalisation et conjugaison ont été présentées. La silanisation a notamment montré suffisamment de flexibilité dans le choix du substrat et des fonctions chimiques disponibles en surface.

Enfin, nous avons présenté les différents avantages conférés par l'utilisation de billes magnétiques nano et micrométriques dans les analyses biologiques et en particulier de leur intégration au sein de laboratoires sur puce. Leur utilisation dans des immunocapteurs microfluidiques a montré des performances remarquables en termes de sensibilité, rapidité et facilité d'utilisation. De ce fait, pour permettre le contrôle de ces objets magnétiques au sein des puces microfluidiques, nous avons abordé la fabrication de dispositifs de manipulation intégrés à l'aide d'aimant permanent, de matériaux ferromagnétiques et d'électro-aimants. L'utilisation d'électro-aimants (microbobines) permet notamment une flexibilité dans la conception et une intégration plus facile au sein du dispositif microfluidique. L'intensité du champ magnétique produit peut par ailleurs être modulée en fonction de l'intensité de courant injectée.

Après cette synthèse du chapitre 1, il est désormais possible de mieux appréhender les différentes problématiques de conception du biocapteur sous forme de patch pour la détection des cytokines de la sueur.

Le concept du patch ciblé par ces travaux de thèse est schématisé sur la Figure 1 - 30. Il est composé de deux chambres microfluidiques : une chambre de capture et une chambre de détection. Le patch est appliqué à la peau pour la collecte de la sueur au travers d'une membrane occlusive semi-perméable. Celle-ci est ensuite percolée dans la chambre microfluidique de capture où des billes magnétiques en suspension sont fonctionnalisées avec des anticorps reconnaissant les cytokines. La chambre est réalisée en PDMS afin de disposer d'un support flexible et biocompatible adapté à la peau. Les billes magnétiques sont manipulées au sein de la chambre à l'aide de

microbobines situées à proximité du circuit microfluidique. Les microbobines de cuivre créent un champ magnétique localisé permettant la capture des billes dans le fluide, facilitant leur fonctionnalisation avec les anticorps et la détection des cytokines. Un substrat de matériau magnétique doux (Permalloy) est placé sous les bobines et permet de concentrer davantage les lignes de champ pour intensifier le champ magnétique produit par les bobines. Le mélange de sueur et de billes magnétiques est acheminé dans la seconde chambre pour assurer la détection des complexes billes-biomarqueurs. La surface de la chambre est silanisée et greffée avec des anticorps anti-cytokines. Lors de la détection des cytokines par les billes fonctionnalisées, le complexe formé est ensuite détecté par les anticorps greffés sur la surface de PDMS. Cet immunocomplexe, une fois immobilisé à la surface de la chambre, est finalement détecté et quantifié par fluorescence comme modalité de détection choisie dans cette thèse.

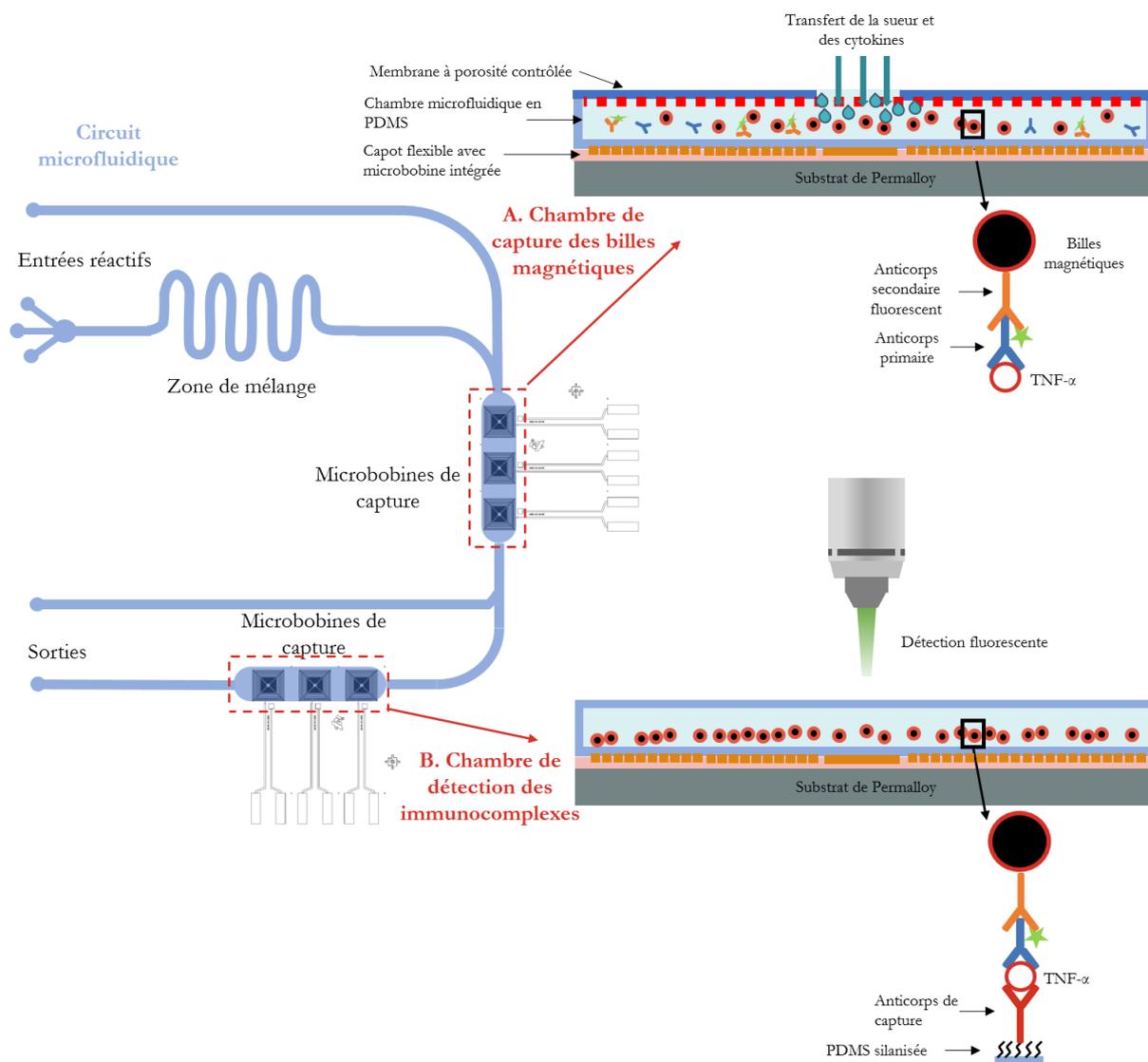


Figure 1- 30. Concept général du patch. Circuit microfluidique intégrant les deux chambres : A. Chambre de capture pour la fonctionnalisation des billes et la détection du TNF- α dans la sueur assisté par les microbobines ; B. Chambre de détection pour la quantification en fluorescence des immunocomplexes immobilisés sur la surface de PDMS silanisé assisté par les microbobines

Cette conception intègre plusieurs briques technologiques à développer au sein des deux chambres microfluidiques lors de cette thèse.

Au sein de la chambre de capture :

- (i) Déterminer les meilleures billes magnétiques pour le greffage des anticorps et la détection du TNF- α ;
- (ii) Fabriquer des microbobines adaptées à la capture des billes magnétiques au sein de la chambre pour faciliter leur fonctionnalisation et la détection du TNF- α ;
- (iii) Optimiser les conditions de capture des billes et de greffage des anticorps sur les billes.

Au sein de la chambre de détection :

- (i) Fonctionnaliser la surface de PDMS au sein de la chambre de détection pour le greffage des anticorps anti-TNF- α nécessaire à la reconnaissance et l'immobilisation du complexe billes-anticorps-TNF- α ;
- (ii) Optimiser les conditions de greffage et de détection du complexe au sein de la chambre.

La Figure 1 - 31 détaille ces différentes étapes de conception avec les critères à valider pour assurer le bon fonctionnement du dispositif final. La suite du manuscrit développe ainsi ces différentes étapes.

Le chapitre 2 contribue au développement de la chambre de détection sur les deux points mentionnés précédemment. Il aborde dans un premier temps le développement d'un protocole de fonctionnalisation du PDMS en pleine plaque par aminosilanisation. La modification de surface est suivie et validée par différentes techniques physico-chimiques jusqu'à la réalisation d'un immunodosage du TNF- α avec détection fluorescente. Dans un second temps, les surfaces silanisées sont intégrées en microfluidique pour la validation de l'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques. Un protocole de passivation du PDMS contre l'adsorption non spécifique des protéines est également présenté.

Le chapitre 3 s'adresse aux problématiques de la chambre de capture et notamment la question du choix du type de billes magnétiques pour le greffage des anticorps et la détection du TNF- α . Une méthode analytique pour la caractérisation des performances de greffage de plusieurs billes magnétiques est présentée. Les billes sont enfin comparées pour la capture et l'élution du TNF- α en solution.

Le chapitre 4 traite enfin des deux autres points mentionnés précédemment pour la chambre de capture avec la fabrication des microbobines de capture et la caractérisation des dispositifs magnéto-fluidiques développés pour la capture des billes magnétiques. Les dispositifs sont appliqués à la capture de billes et au greffage d'anticorps en conditions fluidiques avec une quantification en fluorescence des anticorps greffés. Ce chapitre permet également d'ouvrir la voie vers l'association des deux chambres.

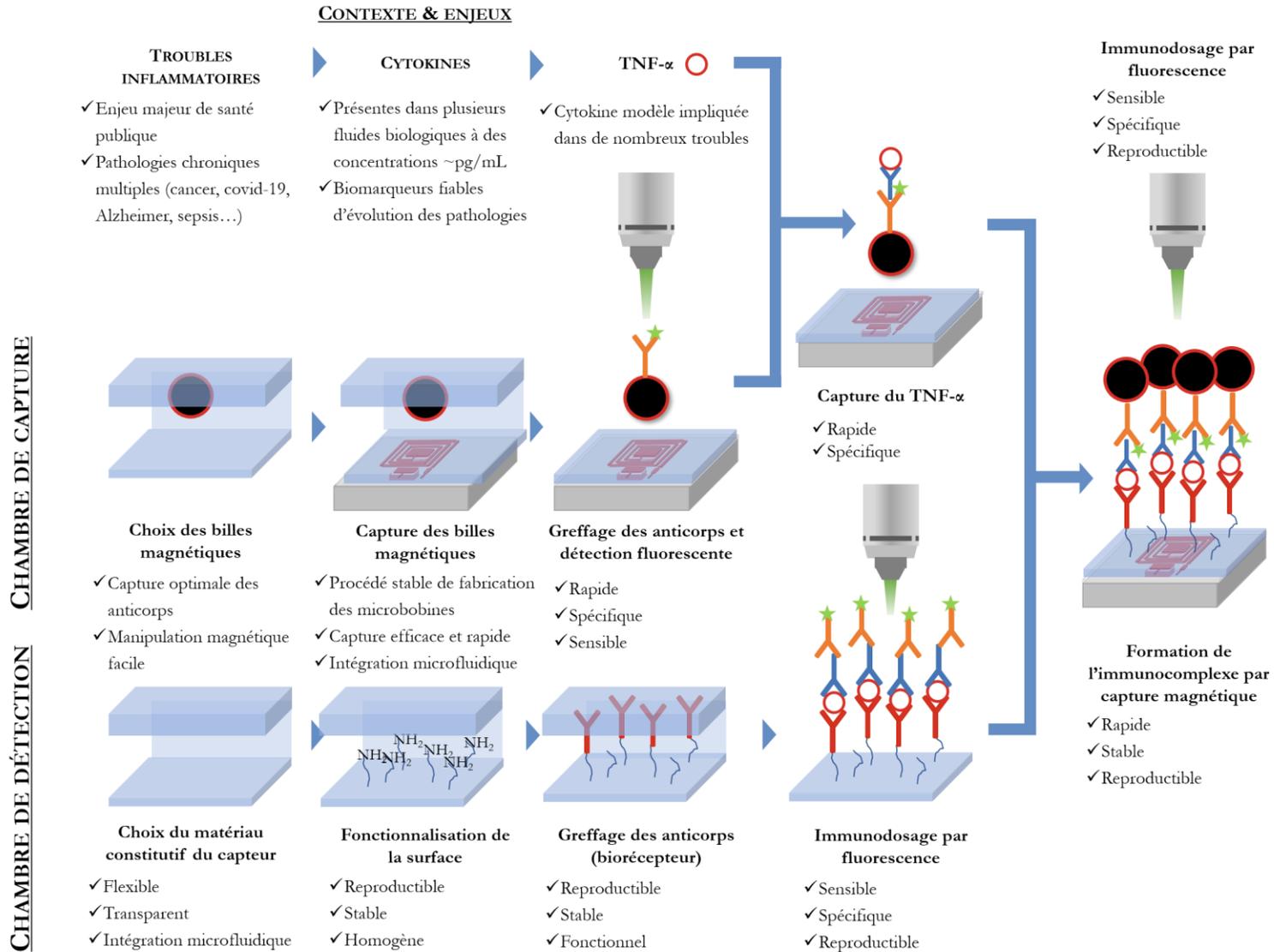


Figure 1 - 31. Les différentes briques technologiques à développer pour la conception du dispositif magnéto-fluidique pour la détection fluorescente du TNF- α

Bibliographie

- [1] P. Hunter, The Inflammation Theory of Disease, *EMBO Rep.* 3 (2012) 1109–1117. doi:10.1039/c2fo30097d.
- [2] D. Furman, J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D.W. Gilroy, A. Fasano, G.W. Miller, A.H. Miller, A. Mantovani, C.M. Weyand, N. Barzilai, J.J. Goronzy, T.A. Rando, R.B. Effros, A. Lucia, N. Kleinstreuer, G.M. Slavich, Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat. Med.* 25 (2019) 1822–1832. doi:10.1038/s41591-019-0675-0.
- [3] H. El-Gabalawy, L.C. Guenther, C.N. Bernstein, Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: Incidence, prevalence, natural history, and comorbidities, *J. Rheumatol.* 37 (2010) 2–10. doi:10.3899/jrheum.091461.
- [4] A.H. Miller, V. Maletic, C.L. Raison, Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression, *Biol. Psychiatry.* 65 (2009) 732–741. doi:10.1016/j.biopsych.2008.11.029.
- [5] A. Yndestad, J.K. Damås, E. Øie, T. Ueland, L. Gullestad, P. Aukrust, Systemic inflammation in heart failure - The whys and wherefores, *Heart Fail. Rev.* 11 (2006) 83–92. doi:10.1007/s10741-006-9196-2.
- [6] Pfizer's Global Policy and International Public Affairs, *Chronic Inflammation and Inflammatory Disease*, 2018.
- [7] V. Jairath, B.G. Feagan, Global burden of inflammatory bowel disease, *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2020) 2–3. doi:10.1016/S2468-1253(19)30358-9.
- [8] P. Jacobs, R. Bissonnette, L.C. Guenther, Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases - Focusing on work productivity and disability, *J. Rheumatol.* 38 (2011) 55–61. doi:10.3899/jrheum.110901.
- [9] L. Chen, H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, L. Zhao, Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget.* 9 (2018) 7204–7218. www.impactjournals.com/oncotarget/.
- [10] G.M. Slavich, M.R. Irwin, From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression, *Psychol. Bull.* 140 (2014) 774–815. doi:10.1037/a0035302.
- [11] A.W. Thomson, M.T. Lotze, *The Cytokine Handbook Fourth edition VOLUME I*, Academic P, 2003.
- [12] P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown, E. Sanchez, R.S. Tattersall, J.J. Manson, COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet.* 395 (2020) 1033–1034. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
- [13] Y. Yang, C. Shen, J. Li, J. Yuan, M. Yang, F. Wang, G. Li, Y. Li, L. Xing, L. Peng, J. Wei, M. Cao, H. Zheng, W. Wu, R. Zou, D. Li, Z. Xu, H. Wang, M. Zhang, Z. Zhang, L. Liu, Y. Liu, Exuberant elevation of IP-10, MCP-3 and IL-1ra during SARS-CoV-2 infection is associated with disease severity and fatal outcome, *MedRxiv.* (2020). doi:10.1101/2020.03.02.20029975.
- [14] G. Dranoff, Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 11–22. doi:10.1038/nrc1252.
- [15] H. Van Gorp, M. Lamkanfi, The emerging roles of inflammasome-dependent cytokines in cancer development, *EMBO Rep.* 20 (2019). doi:10.15252/embr.201847575.
- [16] M. Feldmann, F.M. Brennan, R.N. Maini, Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis, *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 397–440. www.annualreviews.org.
- [17] J. Baliwag, D.H. Barnes, A. Johnston, Cytokines in psoriasis, *Cytokine.* 73 (2015) 342–350. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.014.
- [18] M. Borg, S. Brincat, G. Camilleri, P. Schembri-Wismayer, M. Brincat, J. Calleja-Agius, The

- role of cytokines in skin aging, *Climacteric*. 16 (2013) 514–521. doi:10.3109/13697137.2013.802303.
- [19] L. Gullestad, T. Ueland, L.E. Vinge, A. Finsen, A. Yndestad, P. Aukrust, Inflammatory cytokines in heart failure: Mediators and markers, *Cardiol*. 122 (2012) 23–35. doi:10.1159/000338166.
- [20] G.L. King, The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications, *J. Periodontol*. 79 (2008) 1527–1534. doi:10.1902/jop.2008.080246.
- [21] R.R. Mclean, Proinflammatory Cytokines and Osteoporosis, *Curr. Osteoporos. Rep*. 7 (2009) 134–139.
- [22] M.F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol*. 14 (2014) 329–342. doi:10.1038/nri3661.
- [23] W. Swardfager, K. Lanctt, L. Rothenburg, A. Wong, J. Cappell, N. Herrmann, A meta-analysis of cytokines in Alzheimer’s disease, *Biol. Psychiatry*. 68 (2010) 930–941. doi:10.1016/j.biopsych.2010.06.012.
- [24] M.G. Netea, J.W.M. Van Der Meer, M. Van Deuren, B.J. Kullberg, Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: Not enough, or too much of a good thing?, *Trends Immunol*. 24 (2003) 254–258. doi:10.1016/S1471-4906(03)00079-6.
- [25] C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, B. Cao, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *Lancet*. 395 (2020) 497–506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [26] B. Russell, C. Moss, G. George, A. Santaolalla, A. Cope, S. Papa, M. Van Hemelrijck, Associations between immune-suppressive and stimulating drugs and novel COVID-19—a systematic review of current evidence, *Ecancermedalscience*. 14 (2020). doi:10.3332/ecancer.2020.1022.
- [27] M.J. Carter, M. Fish, A. Jennings, K.J. Doores, P. Wellman, J. Seow, S. Acors, C. Graham, E. Timms, J. Kenny, S. Neil, M.H. Malim, S.M. Tibby, M. Shankar-Hari, Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection, *Nat. Med*. (2020). doi:10.1038/s41591-020-1054-6.
- [28] D.M. Del Valle, S. Kim-Schulze, H.H. Huang, N.D. Beckmann, S. Nirenberg, B. Wang, Y. Lavin, T.H. Swartz, D. Madduri, A. Stock, T.U. Marron, H. Xie, M. Patel, K. Tuballes, O. Van Oekelen, A. Rahman, P. Kovatch, J.A. Aberg, E. Schadt, S. Jagannath, M. Mazumdar, A.W. Charney, A. Firpo-Betancourt, D.R. Mendu, J. Jhang, D. Reich, K. Sigel, C. Cordon-Cardo, M. Feldmann, S. Parekh, M. Merad, S. Gnjatic, An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival, *Nat. Med*. 26 (2020) 1636–1643. doi:10.1038/s41591-020-1051-9.
- [29] S.H. Faulkner, K.L. Spilisbury, J. Harvey, A. Jackson, J. Huang, M. Platt, A. Tok, M.A. Nimmo, The detection and measurement of interleukin-6 in venous and capillary blood samples, and in sweat collected at rest and during exercise, *Eur. J. Appl. Physiol*. 114 (2014) 1207–1216. doi:10.1007/s00421-014-2851-8.
- [30] A.H. Miller, C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target, *Nat. Rev. Immunol*. 16 (2015). doi:10.1038/nri.2015.5.
- [31] A. Kaltenboeck, C. Harmer, The neuroscience of depressive disorders: A brief review of the past and some considerations about the future, *Brain Neurosci. Adv*. 2 (2018) 239821281879926. doi:10.1177/2398212818799269.
- [32] Y. Dowlati, N. Herrmann, W. Swardfager, H. Liu, L. Sham, E.K. Reim, K.L. Lanctôt, A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression, *Biol. Psychiatry*. 67 (2010) 446–457. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033.
- [33] G. Cizza, A.H. Marques, F. Eskandari, I.C. Christie, S. Torvik, M.N. Silverman, T.M.

- Phillips, E.M. Sternberg, Elevated Neuroimmune Biomarkers in Sweat Patches and Plasma of Premenopausal Women with Major Depressive Disorder in Remission: The POWER Study, *Biol. Psychiatry*. 64 (2008) 907–911. doi:10.1016/j.biopsych.2008.05.035.
- [34] A. Marques-Deak, G. Cizza, F. Eskandari, S. Torvik, I.C. Christie, E.M. Sternberg, T.M. Phillips, Measurement of cytokines in sweat patches and plasma in healthy women: Validation in a controlled study, *J. Immunol. Methods*. 315 (2006) 99–109. doi:10.1016/j.jim.2006.07.011.
- [35] C.L. Raison, R.E. Rutherford, B.J. Woolwine, C. Shuo, P. Schettler, D.F. Drake, E. Haroon, A.H. Miller, A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: The role of baseline inflammatory biomarkers, *Arch. Gen. Psychiatry*. 70 (2013) 31–41. doi:10.1001/2013.jamapsychiatry.4.
- [36] K.C. Conlon, M.D. Miljkovic, T.A. Waldmann, Cytokines in the Treatment of Cancer, *J. Interf. Cytokine Res*. 39 (2019) 6–21. doi:10.1089/jir.2018.0019.
- [37] P.C. Taylor, *Anti-cytokines and Cytokines in the Treatment of Rheumatoid Arthritis*, 2003.
- [38] J.A. Stenzen, A.J. Poschenrieder, Bioanalytical chemistry of cytokines - A review, *Anal. Chim. Acta*. 853 (2015) 95–115. doi:10.1016/j.aca.2014.10.009.
- [39] M. Mandel, G. Harari, M. Gurevich, A. Achiron, Cytokine prediction of mortality in COVID19 patients, *Cytokine*. 134 (2020). doi:10.1016/j.cyto.2020.155190.
- [40] Z. Sonner, E. Wilder, J. Heikenfeld, G. Kasting, F. Beyette, D. Swaile, F. Sherman, J. Joyce, J. Hagen, N. Kelley-Loughnane, R. Naik, The microfluidics of the eccrine sweat gland, including biomarker partitioning, transport, and biosensing implications, *Biomicrofluidics*. 9 (2015). doi:10.1063/1.4921039.
- [41] S.S. Çomoğlu, H. Güven, M. Acar, G. Öztürk, B. Koçer, Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease, *Neurosci. Lett*. 553 (2013) 63–67. doi:10.1016/j.neulet.2013.08.019.
- [42] C. Costagliola, V. Romano, M. De Tollis, F. Aceto, R. Dell'Omo, M.R. Romano, C. Pedicino, F. Semeraro, TNF-alpha levels in tears: A novel biomarker to assess the degree of diabetic retinopathy, *Mediators Inflamm*. 2013 (2013). doi:10.1155/2013/629529.
- [43] V. Brailo, V. Vučićević-Boras, A. Cekić-Arambašin, I.Ž. Alajbeg, A. Milenović, J. Lukač, The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia, *Oral Oncol*. 42 (2006) 370–373. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.09.001.
- [44] F.G. Bellagambi, A. Baraket, A. Longo, M. Vatteroni, N. Zine, J. Bausells, R. Fuoco, F. Di Francesco, P. Salvo, G.S. Karanasiou, D.I. Fotiadis, A. Menciacchi, A. Errachid, Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure, *Sensors Actuators, B Chem*. 251 (2017) 1026–1033. doi:10.1016/j.snb.2017.05.169.
- [45] R.B. Alexander, S. Ponniah, J. Hasday, J.R. Hebel, Elevated Levels Of Proinflammatory Cytokines In The Semen Of Patients With Chronic Prostatitis/ Chronic Pelvic Pain Syndrome, *Urology*. (1998).
- [46] M.D. Hladek, S.L. Szanton, Y.E. Cho, C. Lai, C. Sacko, L. Roberts, J. Gill, Using sweat to measure cytokines in older adults compared to younger adults: A pilot study, *J. Immunol. Methods*. 454 (2018) 1–5. doi:10.1016/j.jim.2017.11.003.
- [47] A. Mena-Bravo, M.D. Luque de Castro, Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 90 (2014) 139–147. doi:10.1016/j.jpba.2013.10.048.
- [48] Y. Sekine, S.B. Kim, Y. Zhang, A.J. Bhandodkar, S. Xu, J. Choi, M. Irie, T.R. Ray, P. Kohli, N. Kozai, T. Sugita, Y. Wu, K. Lee, K.T. Lee, R. Ghaffari, J.A. Rogers, A fluorometric skin-interfaced microfluidic device and smartphone imaging module for: In situ quantitative analysis of sweat chemistry, *Lab Chip*. 18 (2018) 2178–2186. doi:10.1039/c8lc00530c.
- [49] H.B. Lee, M. Meesepong, T.Q. Trung, B.Y. Kim, N.E. Lee, A wearable lab-on-a-patch platform with stretchable nanostructured biosensor for non-invasive immunodetection of

- biomarker in sweat, *Biosens. Bioelectron.* 156 (2020). doi:10.1016/j.bios.2020.112133.
- [50] A. Alizadeh, A. Burns, R. Lenigk, R. Gettings, J. Ashe, A. Porter, M. McCaul, R. Barrett, D. Diamond, P. White, P. Skeath, M. Tomczak, A wearable patch for continuous monitoring of sweat electrolytes during exertion, *Lab Chip.* 18 (2018) 2632–2641. doi:10.1039/c8lc00510a.
- [51] D.P. Rose, M.E. Ratterman, D.K. Griffin, L. Hou, N. Kelley-Loughnane, R.R. Naik, J.A. Hagen, I. Papautsky, J.C. Heikenfeld, Adhesive RFID sensor patch for monitoring of sweat electrolytes, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 62 (2015) 1457–1465. doi:10.1109/TBME.2014.2369991.
- [52] N. Selvaraj, G. Nallathambi, R. Moghadam, A. Aga, Fully Disposable Wireless Patch Sensor for Continuous Remote Patient Monitoring, 2018. doi:10.0/Linux-x86_64.
- [53] J.T. Reeder, J. Choi, Y. Xue, P. Gutruf, J. Hanson, M. Liu, T. Ray, A.J. Bandodkar, R. Avila, W. Xia, S. Krishnan, S. Xu, K. Barnes, M. Pahnke, R. Ghaffari, Y. Huang, J.A. Rogers, Waterproof, electronics-enabled, epidermal microfluidic devices for sweat collection, biomarker analysis, and thermography in aquatic settings, *Sci. Adv.* 5 (2019).
- [54] T. Guinovart, A.J. Bandodkar, J.R. Windmiller, F.J. Andrade, J. Wang, A potentiometric tattoo sensor for monitoring ammonium in sweat, *Analyst.* 138 (2013) 7031–7038. doi:10.1039/c3an01672b.
- [55] S. Anastasova, B. Crewther, P. Bemnowicz, V. Curto, H.M. Ip, B. Rosa, G.Z. Yang, A wearable multisensing patch for continuous sweat monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 139–145. doi:10.1016/j.bios.2016.09.038.
- [56] A.J. Bandodkar, J. Wang, Non-invasive wearable electrochemical sensors: A review, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 363–371. doi:10.1016/j.tibtech.2014.04.005.
- [57] D. Morris, S. Coyle, Y. Wu, K.T. Lau, G. Wallace, D. Diamond, Bio-sensing textile based patch with integrated optical detection system for sweat monitoring, *Sensors Actuators, B Chem.* 139 (2009) 231–236. doi:10.1016/j.snb.2009.02.032.
- [58] Y. Zhao, Q. Zhai, D. Dong, T. An, S. Gong, Q. Shi, W. Cheng, Highly Stretchable and Strain-Insensitive Fiber-Based Wearable Electrochemical Biosensor to Monitor Glucose in the Sweat, *Anal. Chem.* (2019). doi:10.1021/acs.analchem.9b00152.
- [59] W. Gao, S. Emaminejad, H.Y.Y. Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, H.M. Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, D.-H. Lien, G.A. Brooks, R.W. Davis, A. Javey, Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis, *Nature.* (2016) 509–513. doi:10.1038/nature16521.
- [60] C. Liu, T. Xu, D. Wang, X. Zhang, The role of sampling in wearable sweat sensors, *Talanta.* 212 (2020). doi:10.1016/j.talanta.2020.120801.
- [61] J. Choi, R. Ghaffari, L.B. Baker, J.A. Rogers, Skin-interfaced systems for sweat collection and analytics, *Sci. Adv.* 4 (2018). <http://advances.sciencemag.org/>.
- [62] H.Y.Y. Nyein, W. Gao, Z. Shahpar, S. Emaminejad, S. Challa, K. Chen, H.M. Fahad, L.C. Tai, H. Ota, R.W. Davis, A. Javey, A Wearable Electrochemical Platform for Noninvasive Simultaneous Monitoring of Ca²⁺ and pH, *ACS Nano.* 10 (2016) 7216–7224. doi:10.1021/acsnano.6b04005.
- [63] R.N. Fichorova, N. Richardson-Harman, M. Alfano, L. Belec, C. Carbonneil, S. Chen, L. Cosentino, K. Curtis, C.S. Dezzutti, B. Donoval, G.F. Doncel, M. Donaghay, J.C. Grivel, E. Guzman, M. Hayes, B. Herold, S. Hillier, C. Lackman-Smith, A. Landay, L. Margolis, K.H. Mayer, J.M. Pasicznyk, M. Pallansch-Cokonis, G. Poli, P. Reichelderfer, P. Roberts, I. Rodriguez, H. Saidi, R.R. Sassi, R. Shattock, J.E. Cummins, Biological and technical variables affecting immunoassay recovery of cytokines from human serum and simulated vaginal fluid: A multicenter study, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4741–4751. doi:10.1021/ac702628q.
- [64] P. Lacy, J.L. Stow, Cytokine release from innate immune cells: Association with diverse membrane trafficking pathways, *Blood.* 118 (2011) 9–18. doi:10.1182/blood-2010-08-265892.

- [65] G. Liu, M. Qi, M.R. Hutchinson, G. Yang, E.M. Goldys, Recent advances in cytokine detection by immunosensing, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 810–821. doi:10.1016/j.bios.2016.01.020.
- [66] C. Cao, F. Zhang, E.M. Goldys, F. Gao, G. Liu, Advances in structure-switching aptasensing towards real time detection of cytokines, *Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 379–396.
- [67] S.Y. Toh, M. Citartan, S.C.B. Gopinath, T.H. Tang, Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 392–403. doi:10.1016/j.bios.2014.09.026.
- [68] M. Tertis, P.I. Leva, D. Bogdan, M. Suciu, F. Graur, C. Cristea, Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening, *Biosens. Bioelectron.* 137 (2019) 123–132. doi:10.1016/j.bios.2019.05.012.
- [69] S. Giorgi-Coll, M.J. Marín, O. Sule, P.J. Hutchinson, K.L.H. Carpenter, Aptamer-modified gold nanoparticles for rapid aggregation-based detection of inflammation: an optical assay for interleukin-6, *Microchim. Acta.* 187 (2020). doi:10.1007/s00604-019-3975-7.
- [70] D. Wu, E. Katilius, E. Olivas, M. Dumont Milutinovic, D.R. Walt, Incorporation of Slow Off-Rate Modified Aptamers Reagents in Single Molecule Array Assays for Cytokine Detection with Ultrahigh Sensitivity, *Anal. Chem.* 88 (2016) 8385–8389. doi:10.1021/acs.analchem.6b02451.
- [71] D.M. Rissin, C.W. Kan, T.G. Campbell, S.C. Howes, D.R. Fournier, L. Song, T. Piech, P.P. Patel, L. Chang, A.J. Rivnak, E.P. Ferrell, J.D. Randall, G.K. Provuncher, D.R. Walt, D.C. Duffy, Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 595–599. doi:10.1038/nbt.1641.
- [72] A. Ghazavi, A. Ganji, N. Keshavarzian, S. Rabiemajd, G. Mosayebi, Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19, *Cytokine.* 137 (2021). doi:10.1016/j.cyto.2020.155323.
- [73] R. Charrad, A. Berraïes, B. Hamdi, J. Ammar, K. Hamzaoui, A. Hamzaoui, Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: Correlation with inflammatory cytokines TNF- α , IL- β , IL-6 and IL-17A, *Immunobiology.* 221 (2016) 182–187. doi:10.1016/j.imbio.2015.09.009.
- [74] N. Fatima, S.M. Faisal, S. Zubair, M. Ajmal, S.S. Siddiqui, S. Moin, M. Owais, Role of pro-inflammatory cytokines and biochemical markers in the pathogenesis of type 1 diabetes: Correlation with age and glycemic condition in diabetic human subjects, *PLoS One.* 11 (2016). doi:10.1371/journal.pone.0161548.
- [75] A. DiPiazza, K. Richards, F. Batarse, L. Lockard, H. Zeng, A. García-Sastre, R.A. Albrecht, A.J. Sant, Flow Cytometric and Cytokine ELISpot Approaches To Characterize the Cell-Mediated Immune Response in Ferrets following Influenza Virus Infection, *J. Virol.* 90 (2016) 7991–8004. doi:10.1128/jvi.01001-16.
- [76] S. Hayashi, R. Imanishi, M. Adachi, S. Ikejima, J. Nakata, S. Morimoto, F. Fujiki, S. Nishida, A. Tsuboi, N. Hosen, H. Nakajima, K. Hasegawa, Y. Oka, H. Sugiyama, Y. Oji, Reader-free ELISpot assay for immuno-monitoring in peptide-based cancer vaccine immunotherapy, *Biomed. Reports.* 12 (2020) 244–250. doi:10.3892/br.2020.1289.
- [77] J.Y. Kim, Y.A. Kang, J.H. Park, H.H. Cha, N.Y. Jeon, S.W. Lee, S.O. Lee, S.H. Choi, Y.S. Kim, J.H. Woo, S.H. Kim, An IFN- γ and TNF- α dual release fluorospot assay for diagnosing active tuberculosis, *Clin. Microbiol. Infect.* 26 (2020) 928–934. doi:10.1016/j.cmi.2019.11.003.
- [78] Y. Yang, S. Lian, L. Meng, L. Qu, C. Shou, Antibody array revealed PRL-3 affects protein phosphorylation and cytokine secretion, *PLoS One.* 12 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0169665.
- [79] M. Siwetz, A. Blaschitz, A. El-Heliebi, U. Hiden, G. Desoye, B. Huppertz, M. Gauster, TNF- α alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta, *Lab. Investig.* 96 (2016) 428–438. doi:10.1038/labinvest.2015.159.

- [80] J. Wang, Y. Zhou, Y. Li, Y. Xu, G. Liu, Z. Lu, Extensive serum biomarker analysis before and after treatment in healing of diabetic foot ulcers using a cytokine antibody array, *Cytokine*. 133 (2020). doi:10.1016/j.cyto.2020.155173.
- [81] P. Buchegger, U. Sauer, H. Toth-Székely, C. Preininger, Miniaturized protein microarray with internal calibration as point-of-care device for diagnosis of neonatal sepsis, *Sensors*. 12 (2012) 1494–1508. doi:10.3390/s120201494.
- [82] B. Ip, N.A. Cilfone, A.C. Belkina, J. Defuria, M. Jagannathan-Bogdan, M. Zhu, R. Kuchibhatla, M.E. McDonnell, Q. Xiao, T.B. Kepler, C.M. Apovian, D.A. Lauffenburger, B.S. Nikolajczyk, Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote TNF α production, *Obesity*. 24 (2016) 102–112. doi:10.1002/oby.21243.
- [83] J.S. Lehmann, A. Zhao, B. Sun, W. Jiang, S. Ji, Multiplex cytokine profiling of stimulated mouse splenocytes using a cytometric bead-based immunoassay platform, *J. Vis. Exp.* 2017 (2017). doi:10.3791/56440.
- [84] S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, E. Delamarche, High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor α using microfluidic systems, *Lab Chip*. 4 (2004) 563–569. doi:10.1039/b408964b.
- [85] D. Huang, H. Ying, D. Jiang, F. Liu, Y. Tian, C. Du, L. Zhang, X. Pu, Rapid and sensitive detection of interleukin-6 in serum via time-resolved lateral flow immunoassay, *Anal. Biochem.* 588 (2020). doi:10.1016/j.ab.2019.113468.
- [86] T.M. Phillips, E.F. Wellner, Analysis of inflammatory mediators in newborn dried blood spot samples by chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis, in: *Methods Mol. Biol.*, Humana Press Inc., 2019: pp. 185–198. doi:10.1007/978-1-4939-9213-3_13.
- [87] I. Musilova, C. Andrys, M. Holeckova, V. Kolarova, L. Pliskova, M. Drahosova, R. Bolehovska, R. Pilka, K. Huml, T. Cobo, B. Jacobsson, M. Kacerovsky, Interleukin-6 measured using the automated electrochemiluminescence immunoassay method for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes, *J. Matern. Neonatal Med.* 33 (2020) 1919–1926. doi:10.1080/14767058.2018.1533947.
- [88] A. Günther, M. Becker, J. Göpfert, T. Joos, N. Schneiderhan-Marra, Comparison of Bead-Based Fluorescence Versus Planar Electrochemiluminescence Multiplex Immunoassays for Measuring Cytokines in Human Plasma, *Front. Immunol.* 11 (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.572634.
- [89] W. Gao, H.Y.Y. Nyein, Z. Shahpar, L.C. Tai, E. Wu, M. Bariya, H. Ota, H.M. Fahad, K. Chen, A. Javey, Wearable sweat biosensors, in: *Tech. Dig. - Int. Electron Devices Meet. IEDM*, 2017: pp. 6.6.1–6.6.4. doi:10.1109/IEDM.2016.7838363.
- [90] R.C. Reid, I. Mahbub, Wearable self-powered biosensors, *Curr. Opin. Electrochem.* 19 (2020) 55–62. doi:10.1016/j.coelec.2019.10.002.
- [91] P. Li, G.H. Lee, S.Y. Kim, S.Y. Kwon, H.R. Kim, S. Park, From Diagnosis to Treatment: Recent Advances in Patient-Friendly Biosensors and Implantable Devices, *ACS Nano*. 15 (2021) 1960–2004. doi:10.1021/acsnano.0c06688.
- [92] I. Giouroudi, F. Keplinger, Microfluidic biosensing systems using magnetic nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 18535–18556. doi:10.3390/ijms140918535.
- [93] J.R. Windmiller, J. Wang, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis*. 25 (2013) 29–46. doi:10.1002/elan.201200349.
- [94] J. Kim, A.S. Campbell, B.E.F. de Ávila, J. Wang, Wearable biosensors for healthcare monitoring, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 389–406. doi:10.1038/s41587-019-0045-y.
- [95] A.J. Bandodkar, W.J. Jeang, R. Ghaffari, J.A. Rogers, Annual Review of Analytical Chemistry Wearable Sensors for Biochemical Sweat Analysis, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2019. 12 (2019) 1–22. doi:10.1146/annurev-anchem-061318.
- [96] C. Chen, Y. Guo, P. Chen, H. Peng, Recent advances of tissue-interfaced chemical biosensors, *J. Mater. Chem. B.* (2020). doi:10.1039/c9tb02476j.

- [97] M. Singh, J. Truong, W.B. Reeves, J.I. Hahm, Emerging cytokine biosensors with optical detection modalities and nanomaterial-enabled signal enhancement, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017). doi:10.3390/s17020428.
- [98] M. Singh, J. Truong, W.B. Reeves, J.I. Hahm, Emerging cytokine biosensors with optical detection modalities and nanomaterial-enabled signal enhancement, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017). doi:10.3390/s17020428.
- [99] N. Cohen, P. Sabhachandani, A. Golberg, T. Konry, Approaching near real-time biosensing: Microfluidic microsphere based biosensor for real-time analyte detection, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 454–460. doi:10.1016/j.bios.2014.11.018.
- [100] H. Kupcova Skalnikova, K. Vodickova Kepkova, P. Vodicka, Luminex xMAP Assay to Quantify Cytokines in Cancer Patient Serum, in: *Immune Mediat. Cancer. Methods Mol. Biol.*, 2020: pp. 65–88. <http://www.springer.com/series/7651>.
- [101] L.A. Sasso, I.H. Johnston, M. Zheng, R.K. Gupte, A. Ündar, J.D. Zahn, Automated microfluidic processing platform for multiplexed magnetic bead immunoassays, *Microfluid. Nanofluidics*. 13 (2012) 603–612. doi:10.1007/s10404-012-0980-0.
- [102] T.M. Blicharz, W.L. Siqueira, E.J. Helmerhorst, F.G. Oppenheim, P.J. Wexler, F.F. Little, D.R. Walt, Fiber-optic microsphere-based antibody array for the analysis of inflammatory cytokines in saliva, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2106–2114. doi:10.1021/ac802181j.
- [103] K. Zhang, G. Liu, E.M. Goldys, Robust immunosensing system based on biotin-streptavidin coupling for spatially localized femtogram mL⁻¹ level detection of interleukin-6, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 80–86. doi:10.1016/j.bios.2017.11.023.
- [104] V. Borse, R. Srivastava, Fluorescence lateral flow immunoassay based point-of-care nanodiagnostics for orthopedic implant-associated infection, *Sensors Actuators, B Chem.* 280 (2019) 24–33. doi:10.1016/j.snb.2018.10.034.
- [105] X. Yu, D. Scott, E. Dikici, S. Joel, S. Deo, S. Daunert, Multiplexing cytokine analysis: Towards reducing sample volume needs in clinical diagnostics, *Analyst*. 144 (2019) 3250–3259. doi:10.1039/c9an00297a.
- [106] A. Moutsopoulos, E.A. Hunt, D. Broyles, C.A. Pereira, K. Woodward, E. Dikici, A.E. Kaifer, S. Daunert, S. Deo, Bioorthogonal Protein Conjugation: Application to the Development of a Highly Sensitive Bioluminescent Immunoassay for the Detection of Interferon- γ , *Bioconjug. Chem.* 28 (2017). <http://pubs.acs.org>.
- [107] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence, *Phys. Rev. Lett.* 96 (2006). doi:10.1103/PhysRevLett.96.113002.
- [108] B. Zhang, J. Yang, Y. Zou, M. Gong, H. Chen, G. Hong, A.L. Antaris, X. Li, C.L. Liu, C. Chen, H. Dai, Plasmonic micro-beads for fluorescence enhanced, multiplexed protein detection with flow cytometry, *Chem. Sci.* 5 (2014) 4070–4075. doi:10.1039/c4sc01206b.
- [109] M. Valentina, F. Jan, N.L. Peder, Z. Bo, D. Hongjie, K. Pernille, Cytokine detection and simultaneous assessment of rheumatoid factor interference in human serum and synovial fluid using high-sensitivity protein arrays on plasmonic gold chips, *BMC Biotechnol.* 15 (2015). doi:10.1186/s12896-015-0186-0.
- [110] M. Toma, K. Tawa, Polydopamine Thin Films as Protein Linker Layer for Sensitive Detection of Interleukin-6 by Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Spectroscopy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 22032–22038. doi:10.1021/acsami.6b06917.
- [111] N. Cohen, P. Sabhachandani, A. Golberg, T. Konry, Approaching near real-time biosensing: Microfluidic microsphere based biosensor for real-time analyte detection, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 454–460. doi:10.1016/j.bios.2014.11.018.
- [112] J. Wang, Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics, in: *Biosens. Bioelectron.*, 2006: pp. 1887–1892. doi:10.1016/j.bios.2005.10.027.
- [113] R. Monošik, M. Středánský, E. Šturdík, Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis, *J. Clin. Lab. Anal.* 26 (2012) 22–34. doi:10.1002/jcla.20500.
- [114] B. Piro, S. Reisberg, Recent advances in electrochemical immunosensors, *Sensors*

- (Switzerland). 17 (2017). doi:10.3390/s17040794.
- [115] H. Filik, A.A. Avan, Electrochemical immunosensors for the detection of cytokine tumor necrosis factor alpha: A review, *Talanta*. 211 (2020) 120758. doi:10.1016/j.talanta.2020.120758.
- [116] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, M. Sigaud, J. Bausells, A. Errachid, A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection, *Biosens. Bioelectron.* 93 (2017) 170–175. doi:10.1016/j.bios.2016.09.023.
- [117] T. Yang, S. Wang, H. Jin, W. Bao, S. Huang, J. Wang, An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen, *Sensors Actuators, B Chem.* 178 (2013) 310–315. doi:10.1016/j.snb.2012.12.107.
- [118] Z. Yin, Y. Liu, L.P. Jiang, J.J. Zhu, Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 1890–1894. doi:10.1016/j.bios.2010.03.025.
- [119] S.K. Arya, P. Estrela, Electrochemical immunosensor for tumor necrosis factor- α detection in undiluted serum, *Methods*. 116 (2017) 125–131. doi:10.1016/j.ymeth.2016.12.001.
- [120] C. Jiang, M.T. Alam, S.M. Silva, S. Taufik, S. Fan, J.J. Gooding, Unique Sensing Interface That Allows the Development of an Electrochemical Immunosensor for the Detection of Tumor Necrosis Factor α in Whole Blood, *ACS Sensors*. 1 (2016) 1432–1438. doi:10.1021/acssensors.6b00532.
- [121] P. Chen, M.T. Chung, W. McHugh, R. Nidetz, Y. Li, J. Fu, T.T. Cornell, T.P. Shanley, K. Kurabayashi, Multiplex serum cytokine immunoassay using nanoplasmonic biosensor microarrays, *ACS Nano*. 9 (2015) 4173–4181. doi:10.1021/acsnano.5b00396.
- [122] J. Zhu, J. He, M. Verano, A.T. Brimmo, A. Gila, M.A. Qasaimeh, P. Chen, J.O. Aleman, W. Chen, An integrated adipose-tissue-on-chip nanoplasmonic biosensing platform for investigating obesity-associated inflammation, *Lab Chip*. 18 (2018) 3550–3560. doi:10.1039/c8lc00605a.
- [123] J. Martinez-Perdiguero, A. Retolaza, L. Bujanda, S. Merino, Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNF α biomarker in human serum, *Talanta*. 119 (2014) 492–497. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.063.
- [124] Y. Wang, L.J. Tang, J.H. Jiang, Surface-enhanced raman spectroscopy-based, homogeneous, multiplexed immunoassay with antibody-fragments-decorated gold nanoparticles, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9213–9220. doi:10.1021/ac4019439.
- [125] Y. Lai, S. Schlücker, Y. Wang, Rapid and sensitive SERS detection of the cytokine tumor necrosis factor alpha (tnf- α) in a magnetic bead pull-down assay with purified and highly Raman-active gold nanoparticle clusters, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 5993–6000. doi:10.1007/s00216-018-1218-0.
- [126] M.S. Luchansky, R.C. Bailey, Silicon photonic microring resonators for quantitative cytokine detection and T-cell secretion analysis, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1975–1981. doi:10.1021/ac902725q.
- [127] M. Xu, D. Obodo, V.K. Yadavalli, The design, fabrication, and applications of flexible biosensing devices, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 96–114. doi:10.1016/j.bios.2018.10.019.
- [128] S.R. Corrie, J.W. Coffey, J. Islam, K.A. Markey, M.A.F. Kendall, Blood, sweat, and tears: Developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis, *Analyst*. 140 (2015) 4350–4364. doi:10.1039/c5an00464k.
- [129] Z. Yin, Rapid prototyping of PET microfluidic chips by laser ablation and water-soaking bonding method, *Micro Nano Lett.* 13 (2018) 1302–1305. doi:10.1049/mnl.2018.0193.
- [130] J.M. Li, C. Liu, H.C. Qiao, L.Y. Zhu, G. Chen, X.D. Dai, Hot embossing/bonding of a poly(ethylene terephthalate) (PET) microfluidic chip, *J. Micromechanics Microengineering*. 18 (2008). doi:10.1088/0960-1317/18/1/015008.

- [131] J. Steigert, S. Haeberle, T. Brenner, C. Müller, C.P. Steinert, P. Koltay, N. Gottschlich, H. Reinecke, J. Rühe, R. Zengerle, J. Ducrée, Rapid prototyping of microfluidic chips in COC, *J. Micromechanics Microengineering*. 17 (2007) 333–341. doi:10.1088/0960-1317/17/2/020.
- [132] L. Yi, W. Xiaodong, Y. Fan, Microfluidic chip made of COP (cyclo-olefin polymer) and comparison to PMMA (polymethylmethacrylate) microfluidic chip, *J. Mater. Process. Technol.* 208 (2008) 63–69. doi:10.1016/j.jmatprotec.2007.12.146.
- [133] T.F. Hong, W.J. Ju, M.C. Wu, C.H. Tai, C.H. Tsai, L.M. Fu, Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO₂ laser, *Microfluid. Nanofluidics*. 9 (2010) 1125–1133. doi:10.1007/s10404-010-0633-0.
- [134] M.B. Wabuyele, S.M. Ford, W. Stryjewski, J. Barrow, S.A. Soper, Single molecule detection of double-stranded DNA in poly(methylmethacrylate) and polycarbonate microfluidic devices, *Electrophoresis*. 22 (2001) 3939–3948.
- [135] E.W.K. Young, E. Berthier, D.J. Guckenberger, E. Sackmann, C. Lamers, I. Meyvantsson, A. Huttenlocher, D.J. Beebe, Rapid prototyping of arrayed microfluidic systems in polystyrene for cell-based assays, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1408–1417. doi:10.1021/ac102897h.
- [136] Z. Hao, Z. Wang, Y. Li, Y. Zhu, X. Wang, C.G. De Moraes, Y. Pan, X. Zhao, Q. Lin, Measurement of cytokine biomarkers using an aptamer-based affinity graphene nanosensor on a flexible substrate toward wearable applications, *Nanoscale*. 10 (2018) 21681–21688. doi:10.1039/c8nr04315a.
- [137] L.C. Tai, T.S. Liaw, Y. Lin, H.Y.Y. Nyein, M. Bariya, W. Ji, M. Hettick, C. Zhao, J. Zhao, L. Hou, Z. Yuan, Z. Fan, A. Javey, Wearable Sweat Band for Noninvasive Levodopa Monitoring, *Nano Lett.* 19 (2019) 6346–6351. doi:10.1021/acs.nanolett.9b02478.
- [138] H. Lin, Y. Zhao, S. Lin, B. Wang, C. Yeung, X. Cheng, Z. Wang, T. Cai, W. Yu, K. King, J. Tan, K. Salahi, H. Hojaiji, S. Emaminejad, A rapid and low-cost fabrication and integration scheme to render 3D microfluidic architectures for wearable biofluid sampling, manipulation, and sensing, *Lab Chip*. 19 (2019) 2844–2853. doi:10.1039/c9lc00418a.
- [139] L. Mou, X. Jiang, Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review, *Adv. Healthc. Mater.* 6 (2017). doi:10.1002/adhm.201601403.
- [140] S.B. Im, M.J. Uddin, G.J. Jin, J.S. Shim, A disposable on-chip microvalve and pump for programmable microfluidics, *Lab Chip*. 18 (2018) 1310–1319. doi:10.1039/c8lc00003d.
- [141] T. Wang, M. Zhang, D.D. Dreher, Y. Zeng, Ultrasensitive microfluidic solid-phase ELISA using an actuatable microwell-patterned PDMS chip, *Lab Chip*. 13 (2013) 4190–4197. doi:10.1039/c3lc50783a.
- [142] Kenry, J.C. Yeo, J. Yu, M. Shang, K.P. Loh, C.T. Lim, Highly Flexible Graphene Oxide Nanosuspension Liquid-Based Microfluidic Tactile Sensor, *Small*. 12 (2016) 1593–1604. doi:10.1002/sml.201502911.
- [143] M. Kubo, X. Li, C. Kim, M. Hashimoto, B.J. Wiley, D. Ham, G.M. Whitesides, Stretchable microfluidic radiofrequency antennas, *Adv. Mater.* 22 (2010) 2749–2752. doi:10.1002/adma.200904201.
- [144] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, N. Yaakoubi, M.G. Trivella, A. Elaissari, M. Sigaud, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid, A Flexible Label-Free Biosensor Sensitive and Selective to TNF- α : Application for Chronic Heart Failure, 2014. <http://www.sensorsportal.com>.
- [145] S. Metz, R. Holzer, P. Renaud, Polyimide-based microfluidic devices, *Lab a Chip - Minutuarization Chem. Biol.* 1 (2001) 29–34. doi:10.1039/b103896f.
- [146] J.R. Sempionatto, A. Martin, L. García-Carmona, A. Barfidokht, J.F. Kurniawan, J.R. Moreto, G. Tang, A. Shin, X. Liu, A. Escarpa, J. Wang, Skin-worn Soft Microfluidic Potentiometric Detection System, *Electroanalysis*. 31 (2019) 239–245. doi:10.1002/elan.201800414.
- [147] S. Metz, A. Bertsch, D. Bertrand, P. Renaud, Flexible polyimide probes with microelectrodes

- and embedded microfluidic channels for simultaneous drug delivery and multi-channel monitoring of bioelectric activity, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1309–1318. doi:10.1016/j.bios.2003.11.021.
- [148] A. Zulfiqar, A. Pfreundt, W.E. Svendsen, M. Dimaki, Fabrication of polyimide based microfluidic channels for biosensor devices, *J. Micromechanics Microengineering.* 25 (2015). doi:10.1088/0960-1317/25/3/035022.
- [149] R.L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J.E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, G.H. Altman, In vitro degradation of silk fibroin, *Biomaterials.* 26 (2005) 3385–3393. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.020.
- [150] Q. Lu, X. Wang, H. Zhu, D.L. Kaplan, Surface immobilization of antibody on silk fibroin through conformational transition, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2782–2786. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.001.
- [151] M. Xu, V.K. Yadavalli, Flexible Biosensors for the Impedimetric Detection of Protein Targets Using Silk-Conductive Polymer Biocomposites, *ACS Sensors.* 4 (2019) 1040–1047. doi:10.1021/acssensors.9b00230.
- [152] C.J. Bettinger, K.M. Cyr, A. Matsumoto, R. Langer, J.T. Borenstein, D.L. Kaplan, Silk fibroin microfluidic devices, *Adv. Mater.* 19 (2007) 2847–2850. doi:10.1002/adma.200602487.
- [153] S. Kuppusami, R.H. Oskouei, Parylene Coatings in Medical Devices and Implants: A Review, *Univers. J. Biomed. Eng.* 3 (2015) 9–14. doi:10.13189/ujbe.2015.030201.
- [154] H. Fallahi, J. Zhang, H.P. Phan, N.T. Nguyen, Flexible microfluidics: Fundamentals, recent developments, and applications, *Micromachines.* 10 (2019). doi:10.3390/mi10120830.
- [155] B.J. Jung, J. Kim, J. ah Kim, H. Jang, S. Seo, W. Lee, PDMS-parylene hybrid, flexible microfluidics for real-time modulation of 3D helical inertial microfluidics, *Micromachines.* 9 (2018). doi:10.3390/mi9060255.
- [156] B.T. Good, S. Reddy, R.H. Davis, C.N. Bowman, Tailorable low modulus, reversibly deformable elastomeric thiol-ene materials for microfluidic applications, *Sensors Actuators, B Chem.* 120 (2007) 473–480. doi:10.1016/j.snb.2006.02.040.
- [157] C.F. Carlborg, T. Haraldsson, K. Öberg, M. Malkoch, W. Van Der Wijngaart, Beyond PDMS: Off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices, *Lab Chip.* 11 (2011) 3136–3147. doi:10.1039/c1lc20388f.
- [158] B. Huang, H. Wu, S. Kim, B.K. Kobilka, R.N. Zare, Phospholipid biotinylation of polydimethylsiloxane (PDMS) for protein immobilization, *Lab Chip.* 6 (2006) 369–373. doi:10.1039/b515840k.
- [159] M. Qin, L.K. Wang, X.Z. Feng, Y.L. Yang, R. Wang, C. Wang, L. Yu, B. Shao, M.Q. Qiao, Bioactive surface modification of mica and poly(dimethylsiloxane) with hydrophobins for protein immobilization, *Langmuir.* 23 (2007) 4465–4471. doi:10.1021/la062744h.
- [160] D. Kim, A.E. Herr, Protein immobilization techniques for microfluidic assays, *Biomicrofluidics.* 7 (2013). doi:10.1063/1.4816934.
- [161] A.K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof, Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview, *Analyst.* 138 (2013) 1619–1627. doi:10.1039/c2an36787d.
- [162] A. Gokaltun, M.L. Yarmush, A. Asatekin, O.B. Usta, Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology, *TECHNOLOGY.* 05 (2017) 1–12. doi:10.1142/s2339547817300013.
- [163] L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4025–4053. doi:10.1021/cr8004668.
- [164] L.S.S. Kumar, X. Wang, J. Hagen, R. Naik, I. Papautsky, J. Heikenfeld, Label free nano-apta-sensor for interleukin-6 in protein-dilute bio fluids such as sweat, *Anal. Methods.* 8 (2016) 3440–3444. doi:10.1039/c6ay00331a.
- [165] A.Y. Fadeev, T.J. McCarthy, Self-assembly is not the only reaction possible between alkyltrichlorosilanes and surfaces: monomolecular and oligomeric covalently attached layers

- of dichloro- and trichloroalkylsilanes on silicon, *Langmuir*. 16 (2000) 7268–7274. doi:10.1021/la000471z.
- [166] J. Kim, P. Seidler, L.S. Wan, C. Fill, Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates, *J. Colloid Interface Sci.* 329 (2009) 114–119. doi:10.1016/j.jcis.2008.09.031.
- [167] M. Zhu, M.Z. Lerum, W. Chen, How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica, *Langmuir*. 28 (2012) 416–423. doi:10.1021/la203638g.
- [168] M. Ammar, C. Smadja, L. Giang Thi Phuong, M. Azzouz, J. Vigneron, A. Etcheberry, M. Taverna, E. Dufour-Gergam, A new controlled concept of immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer's biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 40 (2013) 329–335. doi:10.1016/j.bios.2012.07.072.
- [169] M. Ammar, C. Smadja, G.T. Phuong Ly, D. Tandjigora, J. Vigneron, A. Etcheberry, M. Taverna, E. Dufour-Gergam, Chemical engineering of self-assembled alzheimer's peptide on a silanized silicon surface, *Langmuir*. 30 (2014) 5863–5872. doi:10.1021/la500695y.
- [170] J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 698–725. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002.
- [171] G. Sui, J. Wang, C.C. Lee, W. Lu, S.P. Lee, J. V. Leyton, A.M. Wu, H.R. Tseng, Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5543–5551. doi:10.1021/ac060605z.
- [172] L. Yu, C.M. Li, Y. Liu, J. Gao, W. Wang, Y. Gan, Flow-through functionalized PDMS microfluidic channels with dextran derivative for ELISAs, *Lab Chip*. 9 (2009) 1243–1247. doi:10.1039/b816018j.
- [173] R. Zargar, J. Nourmohammadi, G. Amoabediny, Preparation, characterization, and silanization of 3D microporous PDMS structure with properly sized pores for endothelial cell culture, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63 (2016) 190–199. doi:10.1002/bab.1371.
- [174] C. Séguin, J.M. McLachlan, P.R. Norton, F. Lagugné-Labarthe, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) for microfluidic assay applications, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 2524–2531. doi:10.1016/j.apsusc.2009.10.099.
- [175] T. Dong, N.M.M. Pires, Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70 organic photodetectors, *Biosens. Bioelectron.* 94 (2017) 321–327. doi:10.1016/j.bios.2017.03.005.
- [176] E. Melnik, R. Bruck, R. Hainberger, M. Lämmerhofer, Multi-step surface functionalization of polyimide based evanescent wave photonic biosensors and application for DNA hybridization by Mach-Zehnder interferometer, *Anal. Chim. Acta.* 699 (2011) 206–215. doi:10.1016/j.aca.2011.05.017.
- [177] I. Wong, C.M. Ho, Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices, *Microfluid. Nanofluidics.* 7 (2009) 291–306. doi:10.1007/s10404-009-0443-4.
- [178] S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C.E. Sims, G.P. Li, N. Allbritton, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices by ultraviolet polymer grafting, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4117–4123. doi:10.1021/ac025700w.
- [179] Q. He, Z. Liu, P. Xiao, R. Liang, N. He, Z. Lu, Preparation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) stamps by plasma-induced grafting, *Langmuir*. 19 (2003) 6982–6986. doi:10.1021/la020785h.
- [180] R. ISHIHARA, Y. UCHINO, K. HOSOKAWA, M. MAEDA, A. KIKUCHI, Preparation of a Surface-functionalized Power-free PDMS Microchip for MicroRNA Detection Utilizing Electron Beam-induced Graft Polymerization, *Anal. Sci.* 33 (2017) 197–202.
- [181] H. Lee, S.M. Dellatore, W.M. Miller, P.B. Messersmith, Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science* (80-.). 318 (2007) 426–430. doi:10.1126/science.1149504.

- [182] Y.H. Ding, M. Floren, W. Tan, Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization, *Biosurface and Biotribology*. 2 (2016) 121–136. doi:10.1016/j.bsbt.2016.11.001.
- [183] H.W. Chien, W.H. Kuo, M.J. Wang, S.W. Tsai, W.B. Tsai, Tunable micropatterned substrates based on poly(dopamine) deposition via microcontact printing, *Langmuir*. 28 (2012) 5775–5782. doi:10.1021/la300147p.
- [184] I.S. Kwon, C.J. Bettinger, Polydopamine nanostructures as biomaterials for medical applications, *J. Mater. Chem. B*. 6 (2018) 6895–6903. doi:10.1039/c8tb02310g.
- [185] S. Fiorilli, P. Rivolo, E. Descrovi, C. Ricciardi, L. Pasquardini, L. Lunelli, L. Vanzetti, C. Pederzoli, B. Onida, E. Garrone, Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates, *J. Colloid Interface Sci.* 321 (2008) 235–241. doi:10.1016/j.jcis.2007.12.041.
- [186] S.H. Baxamusa, S.G. Im, K.K. Gleason, Initiated and oxidative chemical vapor deposition: A scalable method for conformal and functional polymer films on real substrates, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 5227–5240. doi:10.1039/b900455f.
- [187] J. Xu, K.K. Gleason, Conformal, amine-functionalized thin films by initiated chemical vapor deposition (iCVD) for hydrolytically stable microfluidic devices, *Chem. Mater.* 22 (2010) 1732–1738. doi:10.1021/cm903156a.
- [188] M. Arroyo-Hernández, J. Pérez-Rigueiro, A. Conde, A. Climent, R. Gago, M. Manso, J.M. Martínez-Duart, Characterization of biofunctional thin films deposited by activated vapor silanization, *J. Mater. Res.* 23 (2008) 1931–1939. doi:10.1557/jmr.2008.0241.
- [189] J.N.M. Calvo, M. Elices, G. V. Guinea, J. Pérez-Rigueiro, M. Arroyo-Hernández, Stability and activity of lactate dehydrogenase on biofunctional layers deposited by activated vapor silanization (AVS) and immersion silanization (IS), *Appl. Surf. Sci.* 416 (2017) 965–970. doi:10.1016/j.apsusc.2017.04.123.
- [190] K.G. Pruden, S.P. Beaudoin, Downstream microwave ammonia plasma treatment of polydimethylsiloxane, *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.* 23 (2005) 208–214. doi:10.1116/1.1842131.
- [191] M.J. Wang, Y.I. Chang, F. Poncin-Epaillard, Acid and basic functionalities of nitrogen and carbon dioxide plasma-treated polystyrene, *Surf. Interface Anal.* 37 (2005) 348–355. doi:10.1002/sia.2029.
- [192] H. Hillborg, J.F. Ankner, U.W. Gedde, G.D. Smith, H.K. Yasuda, K. Wikström, Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques, *Polymer (Guildf)*. 41 (2000) 6851–6863. doi:10.1016/S0032-3861(00)00039-2.
- [193] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed., 2013.
- [194] J. Pivetal, F.M. Pereira, A.I. Barbosa, A.P. Castanheira, N.M. Reis, A.D. Edwards, Covalent immobilisation of antibodies in Teflon-FEP microfluidic devices for the sensitive quantification of clinically relevant protein biomarkers, *Analyst*. 142 (2017) 959–968. doi:10.1039/c6an02622b.
- [195] J. Zhang, Y. Chen, M.A. Brook, Facile functionalization of PDMS elastomer surfaces using thiol-ene click chemistry, *Langmuir*. 29 (2013) 12432–12442. doi:10.1021/la403425d.
- [196] D. Lin, Q. Zhao, M. Yan, Surface modification of polydimethylsiloxane microfluidic chips by polyamidoamine dendrimers for amino acid separation, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016). doi:10.1002/app.43580.
- [197] A. Bosnjakovic, M.K. Mishra, H.J. Han, R. Romero, R.M. Kannan, A dendrimer-based immunosensor for improved capture and detection of tumor necrosis factor- α cytokine, *Anal. Chim. Acta*. 720 (2012) 118–125. doi:10.1016/j.aca.2012.01.017.
- [198] Y. Jang, S.Y. Oh, J.K. Park, In situ electrochemical enzyme immunoassay on a microchip with surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1122–1127. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.020.

- [199] G.A. Messina, N. V. Panini, N.A. Martinez, J. Raba, Microfluidic immunosensor design for the quantification of interleukin-6 in human serum samples, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 262–267. doi:10.1016/j.ab.2008.05.055.
- [200] B.-I. Haukanes, C. Kvam, Application of Magnetic Beads in Bioassays, *Nat. Biotechnol.* 11 (1993) 60–63.
- [201] J. He, M. Huang, D. Wang, Z. Zhang, G. Li, Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 84–101. doi:10.1016/j.jpba.2014.04.017.
- [202] B.A. Otiemo, C.E. Krause, J.F. Rusling, Bioconjugation of Antibodies and Enzyme Labels onto Magnetic Beads, *Methods Enzymol.* 571 (2016) 135–150. doi:10.1016/bs.mie.2015.10.005.
- [203] G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, A. Oltmann, J. Kase, J. Thiery, U. Ceglarek, Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin. Chem.* 53 (2007) 421–428. doi:10.1373/clinchem.2006.077834.
- [204] J. Zheng, Z. Lin, L. Zhang, H. Yang, Polydopamine-mediated immobilization of phenylboronic acid on magnetic microspheres for selective enrichment of glycoproteins and glycopeptides, *Sci. China Chem.* 58 (2015) 1056–1064. doi:10.1007/s11426-014-5286-5.
- [205] T.D. Mai, I. Pereiro, M. Hiraoui, J.L. Viovy, S. Descroix, M. Taverna, C. Smadja, Magneto-immuncapture with on-bead fluorescent labeling of amyloid- β peptides: towards a microfluidized-bed-based operation, *Analyst.* 140 (2015) 5891–5900. doi:10.1039/c5an01179e.
- [206] P. Oberacker, P. Stepper, D.M. Bond, S. Höhn, J. Focken, V. Meyer, L. Schelle, V.J. Sugrue, G.J. Jeunen, T. Moser, S.R. Hore, F. von Meyenn, K. Hipp, T.A. Hore, T.P. Jurkowski, Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation, *PLoS Biol.* 17 (2019). doi:10.1371/journal.pbio.3000107.
- [207] E.Q. Song, J. Hu, C.Y. Wen, Z.Q. Tian, X. Yu, Z.L. Zhang, Y.B. Shi, D.W. Pang, Fluorescent-magnetic-biotargeting multifunctional nanobioprobes for detecting and isolating multiple types of tumor cells, *ACS Nano.* 5 (2011) 761–770. doi:10.1021/nn1011336.
- [208] L. Liu, Y. Ma, X. Chen, X. Xiong, S. Shi, Screening and identification of BSA bound ligands from *Puerariae lobata* flower by BSA functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with HPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 887–888 (2012) 55–60. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.008.
- [209] J. Peng, J. Guan, H. Yao, X. Jin, Magnetic colorimetric immunoassay for human interleukin-6 based on the oxidase activity of ceria spheres, *Anal. Biochem.* 492 (2016) 63–68. doi:10.1016/j.ab.2015.09.018.
- [210] T. Jamshaid, E.T.T. Neto, M.M. Eissa, N. Zine, M.H. Kunita, A.E. El-Salhi, A. Elaissari, Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 344–362. doi:10.1016/j.trac.2015.10.022.
- [211] S. Khizar, H. Ben Halima, N.M. Ahmad, N. Zine, A. Errachid, A. Elaissari, Magnetic nanoparticles in microfluidic and sensing: From transport to detection, *Electrophoresis.* 41 (2020) 1206–1224. doi:10.1002/elps.201900377.
- [212] Y. Xianyu, Q. Wang, Y. Chen, Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 106 (2018) 213–224. doi:10.1016/j.trac.2018.07.010.
- [213] J. Gädke, J.W. Thies, L. Kleinfeldt, T. Schulze, R. Biedendieck, I. Rustenbeck, G. Garnweitner, R. Krull, A. Dietzel, Selective manipulation of superparamagnetic nanoparticles for product purification and microfluidic diagnostics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126 (2018) 67–74. doi:10.1016/j.ejpb.2017.09.008.
- [214] A. Van Reenen, A.M. De Jong, J.M.J. Den Toonder, M.W.J. Prins, Integrated lab-on-chip

- biosensing systems based on magnetic particle actuation-a comprehensive review, *Lab Chip*. 14 (2014) 1966–1986. doi:10.1039/c3lc51454d.
- [215] D. Owen, M. Ballard, A. Alexeev, P.J. Hesketh, Rapid microfluidic mixing via rotating magnetic microbeads, *Sensors Actuators, A Phys.* 251 (2016) 84–91. doi:10.1016/j.sna.2016.09.040.
- [216] F. Liu, P. Kc, G. Zhang, J. Zhe, Microfluidic Magnetic Bead Assay for Cell Detection, *Anal. Chem.* 88 (2016) 711–717. doi:10.1021/acs.analchem.5b02716.
- [217] Z. Song, M. Li, B. Li, Y. Yan, Y. Song, Automatic detecting and counting magnetic beads-labeled target cells from a suspension in a microfluidic chip, *Electrophoresis*. 40 (2019) 897–905. doi:10.1002/elps.201800345.
- [218] B.A. Otieno, C.E. Krause, A. Latus, B. V. Chikkaveeraiah, R.C. Faria, J.F. Rusling, On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 53 (2014) 268–274. doi:10.1016/j.bios.2013.09.054.
- [219] Y. Cai, J. Zhu, J. He, W. Yang, C. Ma, F. Xiong, F. Li, W. Chen, P. Chen, Magnet Patterned Superparamagnetic Fe₃O₄/Au Core-Shell Nanoplasmonic Sensing Array for Label-Free High Throughput Cytokine Immunoassay, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019). doi:10.1002/adhm.201801478.
- [220] D. Sun, F. Cao, W. Xu, Q. Chen, W. Shi, S. Xu, Ultrasensitive and Simultaneous Detection of Two Cytokines Secreted by Single Cell in Microfluidic Droplets via Magnetic-Field Amplified SERS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2551–2558. doi:10.1021/acs.analchem.8b05892.
- [221] S. Köster, F.E. Angilè, H. Duan, J.J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A.C. Rowat, C.A. Merten, D. Pisignano, A.D. Griffiths, D.A. Weitz, Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells, *Lab Chip*. 8 (2008) 1110–1115. doi:10.1039/b802941e.
- [222] Z. Feng, S. Zhi, L. Guo, Y. Zhou, C. Lei, An integrated magnetic microfluidic chip for rapid immunodetection of the prostate specific antigen using immunomagnetic beads, *Microchim. Acta.* 186 (2019). doi:10.1007/s00604-019-3349-1.
- [223] Q. Cao, Q. Fan, Q. Chen, C. Liu, X. Han, L. Li, Recent advances in manipulation of micro- and nano-objects with magnetic fields at small scales, *Mater. Horizons*. 7 (2020) 638–666. doi:10.1039/c9mh00714h.
- [224] A. Munaz, M.J.A. Shiddiky, N.T. Nguyen, Recent advances and current challenges in magnetophoresis based micro magnetofluidics, *Biomicrofluidics*. 12 (2018). doi:10.1063/1.5035388.
- [225] N.T. Huang, Y.J. Hwong, R.L. Lai, A microfluidic microwell device for immunomagnetic single-cell trapping, *Microfluid. Nanofluidics*. 22 (2018). doi:10.1007/s10404-018-2040-x.
- [226] Y.C. Hsiao, R. Khojah, X. Li, A. Kundu, C. Chen, D.B. Gopman, A.C. Chavez, T. Lee, Z. Xiao, A.E. Sepulveda, R.N. Candler, G.P. Carman, D. Di Carlo, C.S. Lynch, Capturing magnetic bead-based arrays using perpendicular magnetic anisotropy, *Appl. Phys. Lett.* 115 (2019). doi:10.1063/1.5085354.
- [227] D. Royet, Y. Hériveaux, J. Marchalot, R. Scorretti, A. Dias, N.M. Dempsey, M. Bonfim, P. Simonet, M. Frénéa-Robin, Using injection molding and reversible bonding for easy fabrication of magnetic cell trapping and sorting devices, *J. Magn. Magn. Mater.* 427 (2017) 306–313. doi:10.1016/j.jmmm.2016.10.102.
- [228] S. Van Pelt, A. Frijns, J. Den Toonder, Microfluidic magnetic bead conveyor belt, *Lab Chip*. 17 (2017) 3826–3840. doi:10.1039/c7lc00718c.
- [229] A. Hosseini, D.N. Philpott, L. Soleymani, Enrichment of magnetic particles using temperature and magnetic field gradients induced by benchtop fabricated micro-electromagnets, *Lab Chip*. 17 (2017) 4097–4104. doi:10.1039/c7lc00825b.
- [230] Q. Ramadan, V. Samper, D.P. Poenar, C. Yu, An integrated microfluidic platform for magnetic microbeads separation and confinement, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1693–1702. doi:10.1016/j.bios.2005.08.006.
- [231] V. Silverio, M.J. López-Martínez, F. Franco, M. Amaral, J. Gaspar, S. Cardoso, P.P. Freitas,

- On-Chip Magnetic Nanoparticle Manipulation and Trapping for Biomedical Applications, *IEEE Trans. Magn.* 53 (2017). doi:10.1109/TMAG.2017.2715848.
- [232] H.H. Cao, The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications, Université Paris Saclay, 2016. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01350864>.
- [233] X. Sun, Z. Feng, S. Zhi, C. Lei, D. Zhang, Y. Zhou, An integrated microfluidic system using a micro-fluxgate and micro spiral coil for magnetic microbeads trapping and detecting, *Sci. Rep.* 7 (2017). doi:10.1038/s41598-017-13389-x.
- [234] Z. Feng, S. Zhi, L. Guo, M. Wei, Y. Zhou, C. Lei, A novel integrated microfluidic platform based on micro-magnetic sensor for magnetic bead manipulation and detection, *Microfluid. Nanofluidics.* 22 (2018). doi:10.1007/s10404-018-2107-8.
- [235] S. Zhi, X. Sun, Z. Feng, C. Lei, Y. Zhou, An innovative micro magnetic separator based on 3D micro-copper-coil exciting soft magnetic tips and FeNi wires for bio-target sorting, *Microfluid. Nanofluidics.* 23 (2019). doi:10.1007/s10404-019-2215-0.

Chapitre 2

Modification biochimique de surface du PDMS pour
l'immunodosage du TNF- α

Sommaire

Introduction.....	96
1. Élaboration et caractérisation des surfaces de PDMS.....	97
1.1. Préparation du mélange de PDMS	97
1.2. Préparation des couches de PDMS	98
1.3. Caractérisation des couches de PDMS	99
1.3.1. Étude de la mouillabilité par mesure d'angle de contact	100
1.3.2. Étude de la composition élémentaire de la surface par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)	101
1.3.3. Analyse de la structure chimique de la surface par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	103
1.3.4. Étude de la rugosité de surface par microscopie à force atomique (AFM).....	104
1.3.5. Étude de la réponse fluorescente des surfaces par microscopie optique à fluorescence.....	105
Conclusion intermédiaire de la partie 1	106
2. Fonctionnalisation des couches de PDMS en pleine plaque	107
2.1. Silanisation des couches de PDMS.....	107
2.2. Optimisation des conditions de silanisation et caractérisation.....	108
2.2.1. Étude préliminaire des conditions de silanisation du PDMS	109
Conclusion intermédiaire de la partie 2.2.1	115
2.2.2. Évaluation biochimique des conditions optimisées pour la silanisation du PDMS	115
Conclusion intermédiaire de la partie 2.2.....	125
2.3. Greffage des anticorps anti-TNF- α sur les aminosilanes.....	125
2.3.1. Étude de la concentration de la couche d'anticorps de capture.....	127
2.3.2. Contrôle des performances du PDMS silanisé par rapport au PDMS natif et étude de la spécificité du complexe immunologique	129
2.4. Immunodosage du TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisées.....	133
Conclusion intermédiaire de la partie 2	134
3. Biofonctionnalisation du PDMS en conditions microfluidiques	134
3.1. Fabrication des dispositifs fluidiques pour l'immunodosage	135
3.1.1. Fabrication des canaux.....	135
3.1.2. Stabilité de la silanisation après scellement des puces.....	139
3.2. Protection du PDMS contre l'adsorption non spécifique des protéines	140
3.2.1. Description générale du protocole de passivation avec le PEO.....	140

3.2.2.	Mise en œuvre du protocole de passivation.....	141
3.2.3.	Passivation du capot de PDMS natif pour les puces « contrôles ».....	145
3.2.4.	Passivation des canaux.....	146
3.2.5.	Évaluation de la passivation du PDMS en conditions fluidiques	147
	Conclusion intermédiaire de la partie 3.2.....	148
3.3.	Greffage des anticorps sur les surfaces silanisées en conditions fluidiques.....	149
3.3.1.	Protocole de greffage avec IgG modèles.....	150
3.3.2.	Optimisation du greffage des anticorps et de la détection	150
3.3.3.	Application aux greffages des anticorps de capture anti-TNF- α	153
3.4.	Immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques et évaluation des performances.	154
	Conclusion du chapitre 2.....	158
	Bibliographie.....	159

Introduction

Nous avons défini dans le chapitre précédent les différents éléments d'un biocapteur ainsi que les bénéfices à leur intégration au sein d'un circuit microfluidique. Parmi ces composants figure notamment l'élément de bio reconnaissance permettant la détection de l'analyte, à savoir dans notre cas, des anticorps.

Par ailleurs, nous avons présenté le dispositif final visé nécessitant l'utilisation d'un substrat flexible pour son application sur le corps humain. Ces différentes contraintes orientent le choix du matériau constitutif du biocapteur vers les polymères élastomères, qui offrent cette flexibilité d'utilisation. De plus, le matériau choisi se doit d'être biocompatible, biofonctionnalisable et intégrable en microfluidique. Aussi, nous avons abordé dans le chapitre 1 la fonctionnalisation de différents polymères répondant à ces critères et plus particulièrement le PDMS.

Nous l'avons vu, le PDMS est un polymère très largement utilisé pour des applications biomédicales et en microfluidique, avec de nombreux avantages physiques et chimiques assurant sa stabilité, sa facilité d'emploi et sa biocompatibilité. Du fait de son utilisation généralisée en microfluidique dans les laboratoires de recherche, l'étude de sa biofonctionnalisation présente un intérêt majeur afin de faciliter son intégration dans un dispositif microfluidique pour la biodétection. Pourtant, peu d'études sur sa biofonctionnalisation ont été menées car il s'agit d'un matériau complexe, présentant l'inconvénient d'être très hydrophobe ainsi que d'adsorber les protéines à sa surface et dans son volume en raison de sa porosité.

Néanmoins, plusieurs techniques de traitement de surface permettent de modifier, même momentanément, la surface du PDMS. Il est relativement aisé de produire des groupements actifs silanols -Si-OH à sa surface, ouvrant la voie pour d'autres réactions, notamment la silanisation qui consiste à faire réagir des silanes avec les groupements silanols. Nous nous sommes alors intéressés à la biofonctionnalisation du PDMS par l'intermédiaire d'une réaction de silanisation par le 3-aminopropyl(triethoxy)silane (APTES).

Il s'agit dès lors de résoudre deux problèmes inhérents au matériau, qui seront abordés séparément dans les deux parties suivantes : (i) l'étude et le contrôle de la silanisation du PDMS en vue de sa biofonctionnalisation ; (ii) la protection du PDMS contre l'adsorption non spécifique des protéines en vue d'une application microfluidique de biodétection.

Ainsi, dans ce chapitre, nous développerons d'abord plus en détail le PDMS et ses propriétés avant d'aborder sa préparation pour les applications visées. Nous présenterons ensuite la réaction de silanisation du PDMS par les aminosilanes et le développement d'un protocole de caractérisation afin de contrôler et optimiser le traitement de surface. Les surfaces préparées seront ensuite utilisées pour l'immunodosage du TNF- α en pleine plaque sur du PDMS. Enfin, nous aborderons l'intégration de ces surfaces silanisées dans un dispositif microfluidique, associant un protocole de passivation du PDMS contre l'adsorption non-spécifique, et finirons par l'évaluation de l'immunodosage du TNF- α en conditions microfluidiques.

1. Élaboration et caractérisation des surfaces de PDMS

Dans cette partie, nous commencerons par rappeler les propriétés du PDMS afin de bien comprendre le matériau que nous souhaitons biofonctionnaliser. Puis, nous présenterons les méthodes utilisées pour le préparer et le structurer. Enfin, nous caractériserons par différentes analyses physico-chimiques les propriétés initiales du matériau avant sa modification biochimique.

1.1. Préparation du mélange de PDMS

Le poly(diméthyl)siloxane est un élastomère organo-minéral (composé de carbone, oxygène et hydrogène pour la partie organique, et de silicium pour la partie minérale). Il appartient à la famille des siloxanes, de formule brute générale R_2SiO . L'appellation "silicone", plus connue du grand public, correspond en réalité à des polymères de siloxanes. Dans le cas du PDMS, sa formule est $CH_3[Si(CH_3)_2O]_nSi(CH_3)_3$ où n indique le nombre de répétitions du monomère.

La liaison Si-O est très stable (425 kJ/mol [1]) ce qui confère au PDMS des propriétés particulièrement intéressantes :

- stabilité thermique (-80°C à 300°C)
- stabilité aux rayons UV et aux IR
- stabilité chimique aux acides, bases et certains solvants

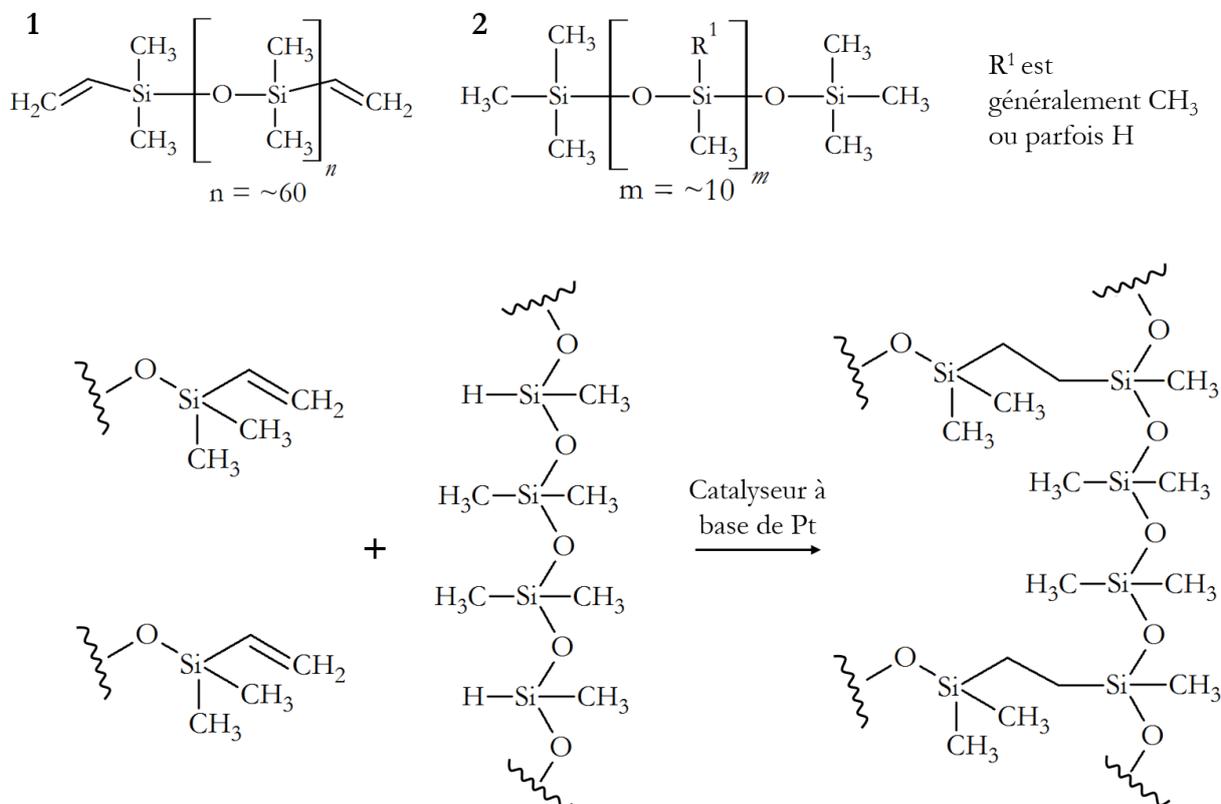


Figure 2 - 1. Réticulation du pré-polymère (1) et du réticulant (2) pour la synthèse du PDMS (adapté de [2])

De même, il est possible d'obtenir différentes propriétés mécaniques en jouant sur la taille de la chaîne de polymère. Le PDMS est fourni sous forme d'un kit de deux composés : un prépolymère (1) (voir Figure 2 - 1) et un réticulant (2) (contenant un catalyseur à base de platine accélérant la réaction de polymérisation). Le prépolymère possède des terminaisons vinyliques ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) tandis que le réticulant possède des liaisons Si-H. Une fois le réticulant ajouté à l'élastomère, le catalyseur à base de platine présent dans la base permet la réaction d'hydrosilylation des groupements vinyliques du prépolymère avec les différents groupements Si-H du réticulant, aboutissant à une structure tri-dimensionnelle comme illustré dans la Figure 2 - 1.

Le mélange est recuit à une température pouvant aller de 50 à 150°C, sur des durées variables d'une vingtaine de minutes à plusieurs heures. Le ratio réticulant/élastomère ainsi que les conditions de recuit (temps et température) affectent les propriétés mécaniques du PDMS obtenu. Plus la proportion de réticulant est importante par rapport à l'élastomère ou plus le recuit est important (en temps ou en température), plus la réaction de réticulation est avancée et plus le PDMS est rigide. Inversement, un PDMS plus mou et élastique est obtenu pour des ratios plus faibles et des recuits plus modérés. La faible viscosité du mélange de PDMS avant recuit permet de l'enduire avec une tournette sur des surfaces pour des épaisseurs allant de quelques microns à plusieurs centaines. Dans notre cas, le PDMS utilisé est celui vendu par la société Dow Corning (Sylgard 184) et est préparé en proportion 1 :10 (réticulant : élastomère) selon un procédé détaillé en annexe.

1.2. Préparation des couches de PDMS

Les couches de PDMS préparées étant destinées à être intégrées dans un dispositif microfluidique, le dimensionnement de ces surfaces a été un choix important. En effet, les dimensions du canal microfluidique doivent respecter certaines contraintes afin d'éviter une instabilité des phénomènes fluidiques au sein du canal. Pour des canaux de plus de 100 μm de profondeur, l'écoulement laminaire est difficile à assurer [3,4]. Pour des canaux plus larges (300-500 μm), il faudra alors diminuer également l'épaisseur. Par ailleurs, en dessous de 50 μm , la résolution des étapes de photolithographie pour la fabrication des canaux perd en reproductibilité. Les canaux obtenus peuvent présenter des aspérités qui perturberaient l'écoulement. Aussi, la hauteur du canal a été fixée à 50 μm . De même, afin de rester en adéquation avec ces dimensions et l'échelle d'interactions des molécules de part et d'autre de la surface biosensible, une épaisseur minimum de 50 μm de PDMS pour la réalisation de cette surface a été choisie.

Pour la préparation de ces couches de PDMS destinées à la fonctionnalisation, un mélange de PDMS 10:1 est préparé selon les indications précédentes. La surface neutre à recouvrir est nettoyée dans un bain d'acétone pendant 5 minutes puis un bain d'isopropanol pendant 5 minutes avant d'être séchée.

Les surfaces utilisées dans les expériences de fonctionnalisation sont des substrats (*wafers*) de silicium de 2 pouces ou des lames de microscope découpées en deux dans la largeur (25 mm x 37.5 mm). Pour ces surfaces, 3 grammes de mélange de PDMS sont en général nécessaires pour obtenir une épaisseur de 50 μm après enduction. Les paramètres d'enduction sur tournette en salle blanche sont les suivants :

Temps : 90 secondes
Vitesse : 1000 rpm
Accélération : 300 rpm/s

Une étude de l'épaisseur obtenue en fonction des paramètres d'enduction a été réalisée en caractérisant les épaisseurs des couches obtenues au profilomètre mécanique (Veeco Dektak 8). La courbe de vitesse d'enrésinement est présentée sur la Figure 2 - 2A.

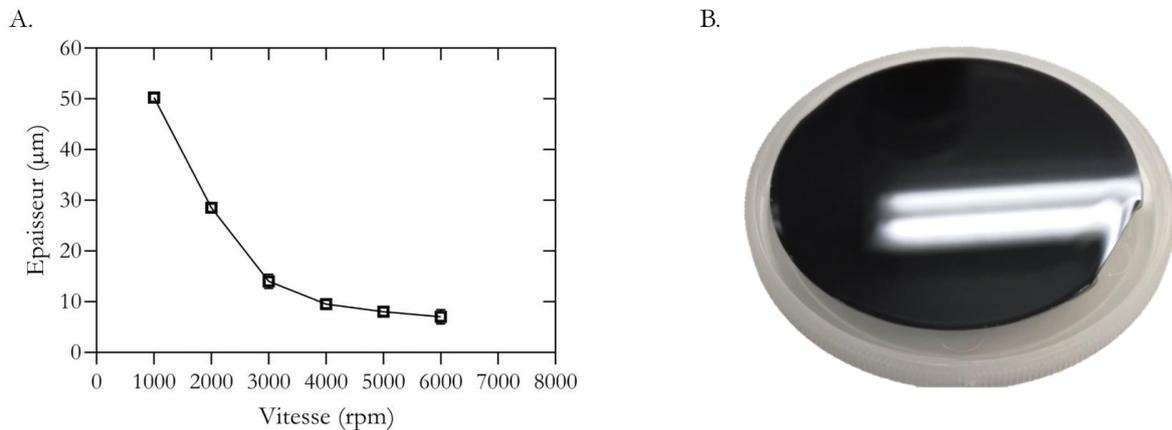


Figure 2 - 2. A. Courbe de vitesse d'enrésinement de PDMS (10 :1) pour 30s d'enduction ; B. Substrat de silicium de 2 pouces recouvert d'une couche de 50 µm de PDMS 10:1

1.3. Caractérisation des couches de PDMS

En vue de la biofonctionnalisation des surfaces ainsi préparées, il est nécessaire d'établir les caractéristiques du substrat initial afin d'en suivre l'évolution au cours du processus de modification biochimique. Pour cela, nous nous sommes intéressés à plusieurs propriétés du PDMS :

- (i) Sa mouillabilité, afin d'évaluer le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface et son évolution en fonction des groupements chimiques disponibles (silanols, amines, chaînes carbonées...);
- (ii) Sa composition élémentaire, afin d'évaluer l'apport de matière et l'évolution des éléments chimiques à la surface du PDMS ;
- (iii) Sa structure chimique, afin de caractériser les liaisons chimiques et interactions des molécules sur la surface ;
- (iv) Sa rugosité, afin d'évaluer les changements topologiques de la surface en fonction des conformations, de la distribution spatiale et de la taille des molécules déposées ;
- (v) Sa réponse fluorescente, afin de connaître la contribution de la surface dans les phénomènes fluorescents intervenant dans l'étape de quantification de l'immuno-capture ;
- (vi) La distribution de ses différentes caractéristiques le long de la surface afin d'évaluer l'homogénéité des modifications intervenant au cours des différentes étapes de fonctionnalisation.

Dans notre cas, nous avons privilégié des techniques de caractérisation rapides et peu invasives afin d'être intégrées au processus de contrôle de la fabrication et de la fonctionnalisation des surfaces en minimisant l'altération de la chimie de surface. De ces techniques, il est alors possible de tirer des caractéristiques qualitatives et quantitatives des modifications de la surface de PDMS afin d'établir les conditions les plus favorables pour sa biofonctionnalisation. Par la suite, le profil obtenu pour le PDMS natif, c'est-à-dire non modifié, pour chacune des techniques présentées sera systématiquement utilisé comme référence pour la comparaison par rapport au PDMS modifié par silanisation.

Pour chacune des méthodes de caractérisation présentées dans cette partie, le principe de fonctionnement est détaillé en annexe.

1.3.1. Étude de la mouillabilité par mesure d'angle de contact

Afin d'évaluer la mouillabilité des surfaces de PDMS préparées et modifiées, les mesures d'angle de contact sont réalisées en salle blanche, à température ambiante, sur un goniomètre Dataphysics OCA20 (voir Figure 2 - 3). Une goutte de 1 μL d'eau déionisée est formée à l'extrémité de l'aiguille à une vitesse de 0.5 $\mu\text{L}/\text{s}$. En fonction de la taille de la surface, 5 à 10 points par échantillon sont mesurés. La moyenne des mesures et l'écart-type sur ces mesures sont ensuite calculés.

Le PDMS est naturellement hydrophobe car sa surface présente de nombreux groupements méthyles $-\text{CH}_3$. Ainsi, la moyenne des angles de contact mesurés sur des surfaces de PDMS natifs est de $116.6 \pm 0.7^\circ$. Des valeurs similaires sont obtenues dans la littérature pour des surfaces de PDMS natif à partir de PDMS Sylgard 10 :1 [5–11], confirmant le caractère hydrophobe de la surface. Les variations possibles autour de ces valeurs peuvent s'expliquer par des rugosités différentes des échantillons présentés. Cela peut notamment être affecté par les modalités de préparation du PDMS pouvant modifier la topologie de la surface (méthode d'enduction, température de recuit, etc.) ainsi que les modalités de mesure de l'angle de contact (volume de goutte par exemple). Il est important de noter que parmi les références citées, nos mesures présentent le plus faible écart-type, attestant de la qualité de la préparation de surface et la fiabilité des mesures pour ces échantillons.

La mouillabilité du PDMS peut être affectée par différents traitements de surface, comme le plasma d'oxygène, diminuant considérablement l'angle de contact à des valeurs inférieures à 5° , ou le greffage d'autres molécules en surface (silanes). Ces mesures seront détaillées dans la partie 2 de ce chapitre.

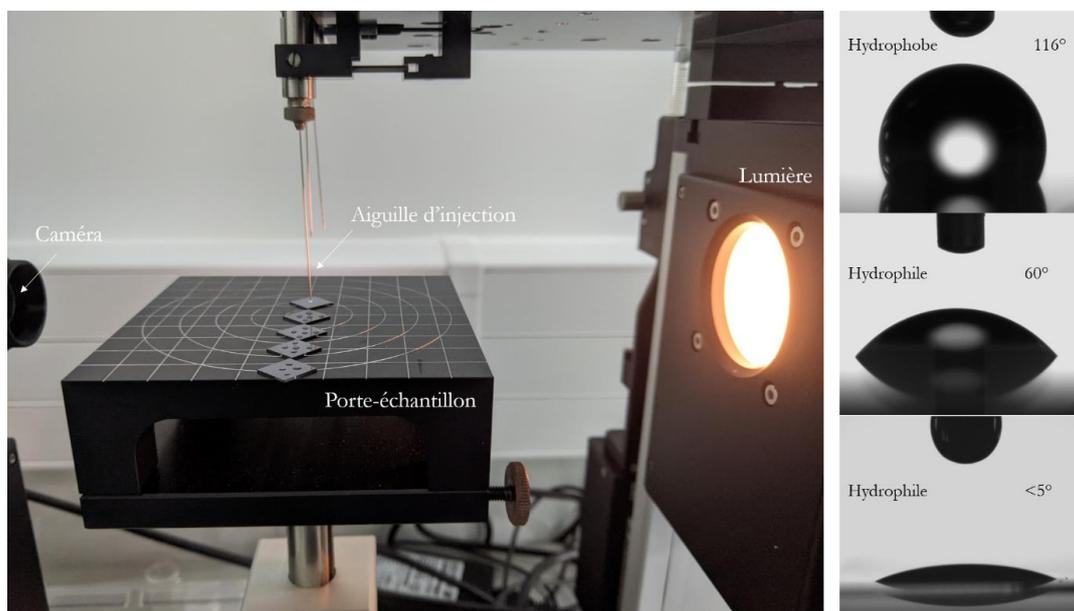


Figure 2 - 3. (à gauche) Image du dispositif de mesure d'angle de contact (à droite) Photographie d'angle de profil de goutte pour la mesure d'angle de contact en fonction de la mouillabilité de la surface de PDMS

1.3.2. Étude de la composition élémentaire de la surface par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX)

Afin d'étudier la composition élémentaire des surfaces de PDMS, des mesures EDX ont été réalisées. Le choix de l'EDX par rapport à la spectrométrie photoélectronique X (XPS), très utilisée pour l'analyse de surface du PDMS, est justifié en annexe. Les mesures sont faites sur un microscope électronique à balayage Hitachi S-3600N équipé d'une sonde à rayons X refroidie à l'azote liquide formant un angle de 30° avec la surface de l'échantillon. Pour l'analyse du PDMS, la tension d'observation varie de 3 à 5 kV avec un biais de correction pour les faibles énergies (*Low Acceleration Bias*). Le temps d'acquisition est fixé à 1 minute et la constante de temps à 50. Le logiciel d'acquisition est Noran System Six.

La Figure 2 - 4 présente le spectre EDX du PDMS natif ainsi que les données d'analyse élémentaire obtenues. Le logiciel fournit le nombre de photons reçus par la sonde pour chaque énergie d'électrons incidents. Pour nos analyses, nous avons utilisé le nombre de coups détectés par élément plutôt que le pourcentage relatif de l'abondance des éléments dans l'échantillon fourni par le logiciel. En effet, pour cette information, le logiciel se base sur des modèles théoriques de distribution des atomes dans un échantillon inorganique, plus couramment étudiés par EDX, plutôt qu'un polymère à la structure plus complexe. Aussi, la distribution relative des éléments est faussée par l'application du modèle et il convient de traiter les données brutes de détection afin de s'en affranchir.

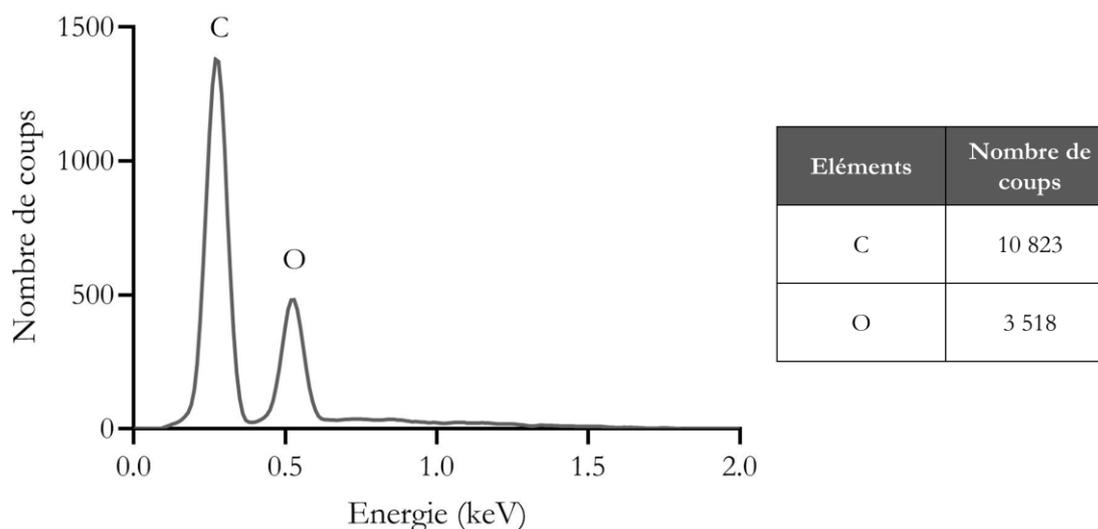


Figure 2 - 4. Spectre EDX d'un échantillon de PDMS et tableau des informations élémentaires obtenues. Tension d'observation 5 kV.

Bien que le PDMS soit composé de carbone, oxygène, silicium et hydrogène, seuls les pics de carbone et d'oxygène apparaissent lors de l'analyse EDX. La détection de l'hydrogène n'est pas possible avec cette technique car, ne possédant qu'un unique électron, il n'y a pas d'autre électron pouvant être éjecté et permettant l'émission d'un rayon X nécessaire à l'analyse (voir le principe de fonctionnement de l'EDX en annexe). Le cas du silicium est plus complexe et dépend de l'accessibilité de l'atome au faisceau d'électrons incident. Si les électrons ont du mal à atteindre le silicium, celui-ci n'apparaîtra pas sur le spectre. En effet, une quantité minimum d'éléments doit être détectable afin d'être quantifiée par l'EDX. Pour le PDMS natif, la surface présente des groupements méthyles $-CH_3$ qui occasionne une gêne stérique importante et masquent le silicium sous-jacent du faisceau d'électrons. De plus, dans la structure des chaînes de PDMS réticulé (voir Figure 2 - 1), le silicium est plus encombré que les autres atomes. Aussi, l'analyse d'un échantillon de PDMS natif dans nos conditions d'observations aboutit à un spectre ne présentant que du carbone et de l'oxygène, avec une prédominance du carbone (10 823 coups) par rapport à l'oxygène (3 518 coups). Ces valeurs reflètent l'abondance des deux éléments dans la structure du polymère. Pour les autres types de surface étudiés par la suite, nous surveillerons l'abondance de ces deux éléments ainsi que l'apparition éventuelle d'autres pics.

Peu d'études ont utilisé l'EDX comme technique de caractérisation du PDMS, et les résultats divergent significativement pour plusieurs raisons. Zhang *et al* [12] obtiennent ainsi un spectre EDX du PDMS natif avec un pic très intense du silicium (55,09%) contre 36% pour l'oxygène et 7,99% pour le carbone. De même, Zargar *et al* [7] analyse du PDMS poreux par EDX et obtiennent un pic intense de silicium à 42,78% contre 13,28% pour l'oxygène et 37,25% pour le carbone. Aucune des deux études ne précise les conditions d'observation et d'analyse du PDMS en EDX. De même, les pourcentages donnés reposent très probablement sur les modèles théoriques de structures inorganiques des matériaux, comme mentionné précédemment, ce qui peut occasionner des écarts de quantification. Enfin, bien que la nature initiale du PDMS soit identique à la nôtre

(Sylgard, ratio 10 :1), les conditions de préparation sont très variables, résultant notamment en des variations importantes dans les caractérisations : Zhang *et al* ont ainsi obtenu un angle de contact de $50 \pm 10^\circ$ pour le PDMS natif, pourtant bien connu pour son hydrophobicité. Aussi, nos analyses EDX reposent sur un choix minutieux des conditions de mesure afin de minimiser l'altération de la surface (par une trop forte tension d'observation par exemple) et assurer une reproductibilité des mesures entre les différents échantillons.

1.3.3. Analyse de la structure chimique de la surface par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Afin de déterminer la structure chimique de la surface de PDMS par la nature des liaisons chimiques et la présence de groupes fonctionnels caractéristiques, des mesures de spectroscopie FTIR ont été réalisées sur un montage composé d'un spectromètre (Varian 670-IR, Agilent) couplé à un microscope (Varian 610-IR, Agilent) équipé de deux objectifs (15x IR, 40x visible). L'acquisition des mesures est faite en mode *Single Point Reflection* afin d'obtenir le spectre en réflexion d'un point de l'échantillon. Le signal issu de l'échantillon est mesuré par un détecteur MCT (Tellurure de Mercure Cadmium) refroidi à l'azote liquide à 77K. La vitesse de balayage du miroir mobile est de 25 kHz (1,58 cm/sec). La lame séparatrice, transparente à l'infrarouge moyen, est en KBr (bromure de potassium). Les zones d'intérêt sont définies à l'aide du microscope en lumière blanche avant la mesure. L'acquisition et l'analyse du spectre sont faites avec le logiciel Varian Pro.

Les paramètres de mesures sont les suivants :

- la résolution du nombre d'onde est fixée à 8 cm^{-1} ,
- la gamme de nombres d'onde de 500 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} pour chaque balayage
- 64 balayages pour l'acquisition du signal de l'échantillon et 96 pour celle du bruit de fond (surface non traitée).

Le spectre obtenu pour l'analyse du PDMS natif est représenté sur la Figure 2 - 5. Nous pouvons distinguer différentes bandes d'absorbance caractéristiques du PDMS :

- 860 cm^{-1} : élongation Si-C et Si-(CH₃)₂
- 1100 à 1250 cm^{-1} : Si-O-Si, liaisons siloxanes formées après réticulation du PDMS ; également Si-CH₃ des groupements méthyls en surface du PDMS
- 2160 cm^{-1} : Si-H
- 2930 cm^{-1} : élongation symétrique et asymétrique des groupements CH_x
- 3600 cm^{-1} : probablement de l'eau adsorbée en surface

Ces résultats sont bien en accord avec les valeurs obtenues par Zargar *et al* [7], Yu *et al* [11], Lin *et al* [13], Nourmohammadi *et al* [9] et Orhan *et al* [14].

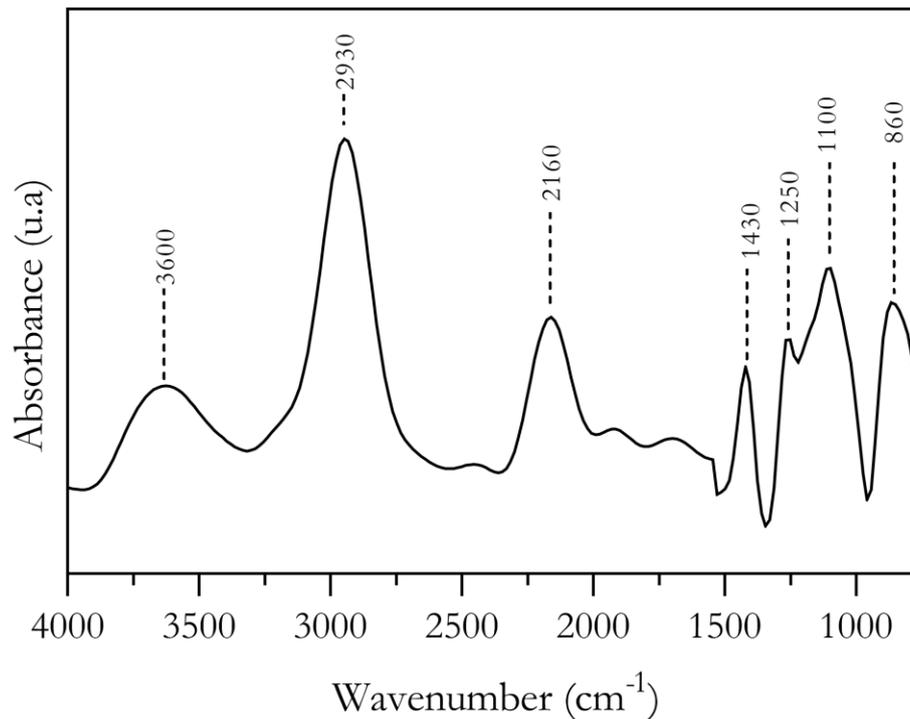


Figure 2 - 5. Spectre FTIR en absorbance du PDMS natif après soustraction du signal du substrat de silicium

1.3.4. Étude de la rugosité de surface par microscopie à force atomique (AFM)

Afin d'étudier les paramètres topologiques des surfaces de PDMS, des mesures de rugosité par microscopie AFM ont été réalisées sur un microscope Agilent Pico Plus 5500 LS en mode tapping à l'air ambiant avec une pointe en silicium sur une surface de $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$.

L'analyse de l'échantillon de PDMS natif montre une surface relativement lisse avec une rugosité RMS de 1.01 nm (voir Figure 2 - 6). Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans la littérature pour des surfaces de PDMS natif. Zhang *et al* [12] ont ainsi mesuré une rugosité RMS de 2.67 nm et Chuah *et al* [10] une RMS de 2.895 ± 0.055 nm. Dans notre cas, les valeurs de RMS encore plus faibles montrent notamment que la méthode de préparation des surfaces de PDMS par enduction centrifuge est stable et permet d'obtenir des surfaces particulièrement lisses et homogènes, soit un excellent substrat de départ pour les étapes de fonctionnalisation ultérieures.

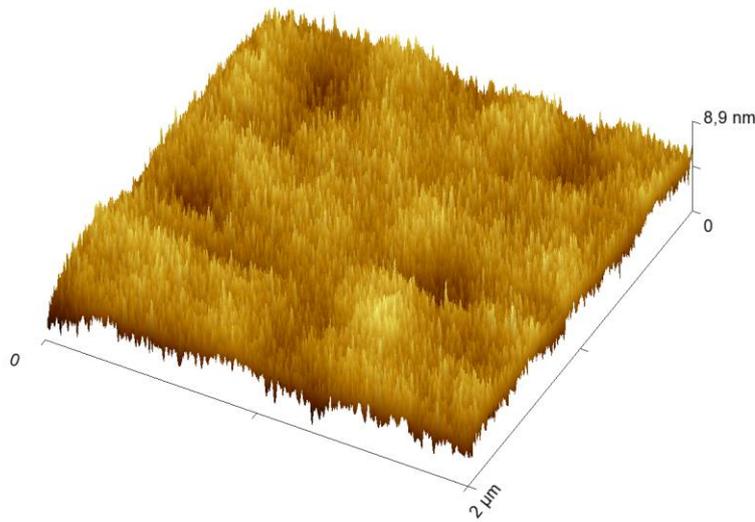


Figure 2 - 6. Mesure AFM sur un échantillon de PDMS natif

1.3.5. Étude de la réponse fluorescente des surfaces par microscopie optique à fluorescence

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons décrit le système final visé dans cette thèse. Celui-ci intègre une chambre de détection comportant la surface de PDMS biofonctionnalisée avec des anticorps dirigés contre le TNF- α . La détection des complexes d'anticorps ayant capturé l'antigène est assurée par un marqueur fluorescent quantifié par microscopie à fluorescence. Aussi, afin d'évaluer la réponse fluorescente du matériau natif (autofluorescence), les surfaces de PDMS ont été étudiées par microscopie à fluorescence. Les mesures sont effectuées sur un microscope optique inversé à large champ Axio Observer Zeiss avec un grossissement $\times 10$ et un temps d'acquisition variable en fonction des observations (1500 ms pour les anticorps FITC et 300 ms pour la fluorescamine). Les diodes lasers sont réglées à 50% de leur puissance pour l'excitation. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées sont de 385 nm pour les expériences avec la fluorescamine et 475 nm pour les anticorps marqués FITC. Les images sont acquises par le logiciel Zen Pro et exportées pour être traitées sur le logiciel Icy [15] afin d'optimiser la quantification de la réponse en fluorescence des échantillons étudiés.

Dans cette gamme de longueurs d'ondes choisies pour les mesures, le PDMS présente de l'auto-fluorescence correspond aux propriétés optiques intrinsèques du matériau. La contribution du PDMS natif au signal fluorescent a donc été mesurée sur les échantillons de PDMS afin qu'elle soit par la suite déduite des mesures de fluorescence en présence de marqueurs spécifiques. Pour chaque quantification effectuée dans ce chapitre, il sera précisé si l'autofluorescence du PDMS a été soustraite ou non des valeurs de fluorescence indiquées.

Il est important de noter que ces valeurs diffèrent selon la structure de l'échantillon. Dans le cas de la puce, le faisceau de lumière rencontre d'abord une lame de microscope avant d'atteindre la surface de PDMS, ce qui modifie la diffusion du faisceau dans l'échantillon et la réponse fluorescente mesurée.

Tableau 2 - 1. Récapitulatif de la réponse fluorescente des surfaces de PDMS en fonction de la longueur d'onde d'observation et du type d'échantillon

Type d'échantillon	Longueur d'onde d'observation	Réponse fluorescence du PDMS natif
Surface de 50 μm de PDMS sur silicium	385 nm	10.47 ± 0.03 u.a
	475 nm	15.34 ± 0.05 u.a
Microcanal de PDMS sur lame de microscope	385 nm	18.02 ± 0.42 u.a
	475 nm	24.02 ± 0.34 u.a

Conclusion intermédiaire de la partie 1

Pour résumer, nous venons de présenter les différentes méthodes de caractérisation employées dans l'étude de la biofonctionnalisation du PDMS. Ces méthodes permettent d'évaluer différentes caractéristiques des couches de PDMS au cours du processus de modification biochimique afin d'identifier des conditions optimales de silanisation et suivre la qualité des échantillons. Nous avons également présenté les caractéristiques du PDMS natif afin d'établir l'état initial du substrat avant sa modification. Dans la partie suivante nous allons nous intéresser à la silanisation de couches de PDMS dans le but de développer un protocole stable pour la biofonctionnalisation en vue de l'immunodosage du TNF- α .

2. Fonctionnalisation des couches de PDMS en pleine plaque

Dans cette seconde partie, nous allons étudier la biofonctionnalisation du PDMS qui sera intégré dans la chambre de détection au sein du dispositif. Comme nous venons de le voir, le PDMS est un matériau complexe, naturellement hydrophobe et poreux, ce qui lui confère une certaine affinité non contrôlée et non spécifique pour les biomolécules comme les protéines. Afin d'éviter une agrégation des protéines à sa surface et un greffage incontrôlé des anticorps nécessaires à la biodétection, nous nous sommes intéressés à l'aminosilanisation du PDMS. L'objectif consiste à aboutir à des conditions réactionnelles favorables afin de créer une couche d'aminosilane en surface du polymère, servant d'ancrage stable pour la conjugaison avec les anticorps. Il sera alors possible de contrôler davantage l'immobilisation des biomolécules et donc d'assurer de meilleures performances de détection en termes de reproductibilité, stabilité, spécificité et sensibilité.

La première partie de cette section présente de façon générale le protocole de silanisation. La seconde partie porte sur l'étude préliminaire des conditions de silanisation intégrant les différentes techniques de caractérisation physico-chimique introduites dans la partie précédente afin de définir les conditions favorables pour une silanisation contrôlée. La troisième partie développe une analyse plus approfondie des conditions sélectionnées afin de valider la présence des fonctions amines libres en surface. Enfin, les deux dernières parties concernent l'application des surfaces préparées aux greffages des anticorps anti-TNF- α et à l'immunodosage du TNF- α par détection fluorescente.

2.1. Silanisation des couches de PDMS

Nous allons tout d'abord nous intéresser à la silanisation du PDMS par l'APTES en vue d'obtenir des groupements amines disponibles pour le greffage des anticorps sur la surface. Le principe général des réactions de silanisation a été abordé dans le chapitre 1. Cette étude est réalisée en pleine plaque sur les surfaces de PDMS réalisées dans la partie précédente. L'intérêt d'étudier des surfaces pleines plaques avant l'intégration en microfluidique réside dans la facilité d'accès aux propriétés de ces surfaces *via* les différentes techniques d'analyses physico-chimiques présentées dans la partie 1 de ce chapitre. La compréhension des paramètres influençant la qualité de la silanisation et les phénomènes intervenant aux interfaces est indispensable pour optimiser le protocole de silanisation avant l'intégration en microfluidique. Enfin, la silanisation d'une surface suffisamment large pour être assemblée avec plusieurs canaux au sein d'une seule puce permet de faciliter la parallélisation du dispositif fluidique et d'assurer une homogénéité de la réponse entre les canaux d'une même puce.

Pour cette réaction, l'aminosilane sélectionné est le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, $M_w = 221$ g/mol, pureté $\geq 98,5\%$, 440140, Sigma-Aldrich), un silane très couramment utilisé et disponible commercialement. La silanisation du PDMS par l'APTES nécessite la formation de liaisons covalentes entre la surface de PDMS et les molécules d'APTES.

Pour cela, plusieurs points doivent être respectés :

(i) L'activation de la surface de PDMS

La surface est oxydée par plasma O₂ afin de remplacer les groupements méthyles -CH₃ par des groupements silanols Si-OH nécessaires pour la réaction avec les molécules de silane.

(ii) L'hydrolyse partielle du silane

Cette étape est nécessaire afin d'activer le silane en vue d'une réaction de condensation avec les groupements silanols en surface pour former une liaison siloxane Si-O-Si [16]. Pour qu'elle ait lieu, il faut une quantité minimum d'eau dans le milieu (principalement adsorbée à la surface de l'échantillon, résiduelle dans le solvant, et indirectement dans l'atmosphère ambiante). En revanche, trop d'eau provoquerait une hydrolyse trop rapide des molécules de silane et la polymérisation incontrôlée de l'APTES. Dans notre cas, les réactions sont effectuées dans de la verrerie sèche, placée en étuve et dans une boîte à gants afin d'assurer une hygrométrie suffisamment basse (<5%).

(iii) Le choix du solvant

L'APTES est soluble dans de nombreux solvants organiques. Les plus couramment utilisés sont l'acétone, le toluène, le chloroforme et l'éthanol. Pour la silanisation du PDMS, notre choix s'est porté sur l'éthanol absolu (non anhydre) car il est compatible avec le PDMS, contrairement aux autres solvants pouvant conduire à son gonflement [17].

(iv) Le maintien de conditions opératoires stables

La silanisation est une réaction sensible à la température, à l'eau, aux impuretés. Zhu *et al* [18] ont notamment rassemblé dans un article les différents paramètres influençant la qualité de préparation des silanes sur des substrats de silice. Aussi, les réactions et la préparation des solutions et des échantillons ont été effectuées en salle blanche, à 20°C. La verrerie utilisée est nettoyée avec soin et le flacon d'APTES doit être exempt d'impuretés qui viennent à se former avec le vieillissement de la bouteille. Nous avons pu constater que des écarts dans ces conditions de travail dégradent significativement la qualité de la silanisation et les performances des surfaces préparées.

Les différentes étapes du protocole de silanisation sont schématisées sur la Figure 2 - 7. Le protocole détaillé de la silanisation est présenté en annexe.

2.2. Optimisation des conditions de silanisation et caractérisation

Après avoir abordé les conditions générales et les différentes étapes de la réaction de silanisation du PDMS, deux paramètres restent à discuter : le temps de réaction et la concentration en APTES. En effet, ces deux paramètres font partie des paramètres réactionnels les plus importants à contrôler pour assurer la qualité de la silanisation et éviter l'agrégation des silanes en surface [16]. Peu d'études se sont réellement intéressées à la silanisation du PDMS et au contrôle de ces paramètres en vue de la préparation d'une surface biofonctionnalisable. Aussi, il nous a fallu initialement définir une gamme d'étude de ces deux paramètres afin d'aboutir aux conditions favorables pour la formation d'une couche homogène et stable de silane à la surface du polymère. Ces conditions ont alors été évaluées selon les différentes techniques de caractérisation physico-chimiques préalablement appliquées au PDMS natif.

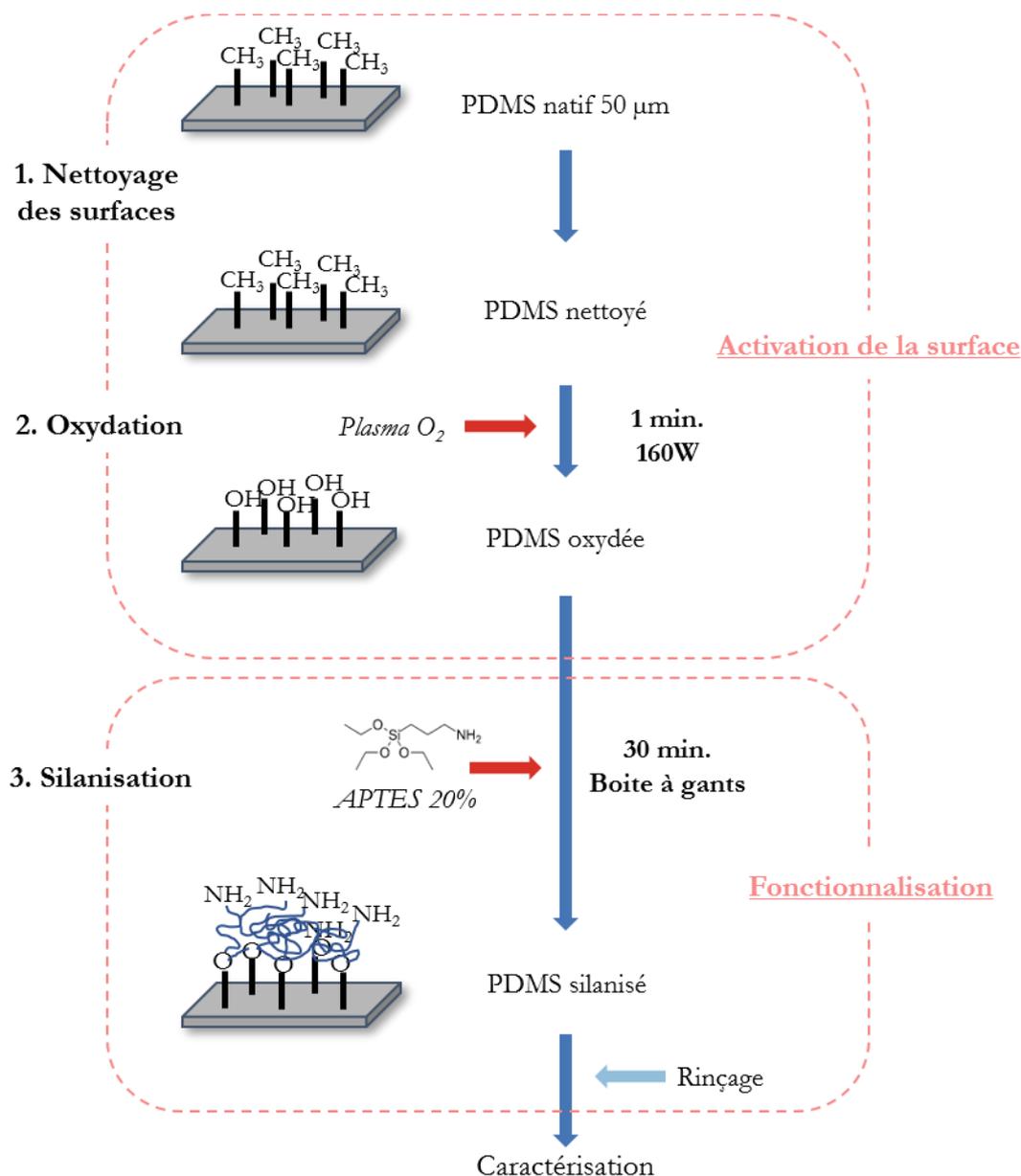


Figure 2 - 7. Les différentes étapes de la silanisation du PDMS par l'APTES

2.2.1. Étude préliminaire des conditions de silanisation du PDMS

Afin de préciser la gamme d'étude en temps et concentration pour la réaction, une analyse préliminaire de la littérature sur la silanisation du PDMS a montré la variété des protocoles utilisés pour ce type de réaction. Parmi les travaux utilisant l'APTES dans l'éthanol, Yu *et al* [11] et Pinto *et al* [19], ont utilisé des concentrations d'APTES à 50% dans l'éthanol, tandis que Khnouf *et al* [20] et Yu *et al* [21] ont opté pour 10% d'APTES. Enfin, Sunkara *et al* [22] ont utilisé une concentration de 1% contre 30% pour Beal *et al* [6]. Les temps de réaction s'étalent par ailleurs de 5 minutes à 30 minutes. Aussi, nous avons choisi de balayer les conditions de concentration de 10 à 50%, pour des temps de réaction s'écoulant de 15 minutes à 1 heure.

Les modifications de surfaces occasionnées par les différents traitements au cours du protocole de silanisation ont été initialement suivies par mesure d'angle de contact et spectroscopie EDX. La conjugaison des deux techniques est nécessaire pour tirer des conclusions fiables sur cette étude préliminaire des conditions de silanisation. Pour chaque condition réactionnelle, 3 répliques ont été caractérisées par ces deux méthodes afin d'établir la moyenne et l'écart-type sur les mesures.

2.2.1.1. Étude de la mouillabilité par angle de contact

Nous avons vu dans la partie 1.3.1 que le PDMS natif était naturellement hydrophobe avec un angle de contact mesuré de $116.6 \pm 0.7^\circ$. Lors de la silanisation, les groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) abondant sur la surface du polymère sont oxydés en groupement hydroxyles ($-\text{OH}$) par le plasma d'oxygène. La mouillabilité de la surface en est sensiblement affectée : les groupes méthyles étant essentiellement carbonés, ils sont en partie responsables de l'hydrophobicité native du matériau ; en revanche les groupements hydroxyles sont de natures hydrophiles et font diminuer drastiquement l'angle de contact mesuré à des valeurs inférieures à 5° (sous la limite de détection du goniomètre). Cependant, ce changement n'est pas stable dans le temps et le PDMS aura tendance à retrouver son hydrophobicité au fil des heures et des jours [23], comme le montre la Figure 2 - 8 où une étude de l'angle de contact d'échantillons de PDMS oxydés par plasma a été effectuée sur plusieurs jours.

Sur les premières heures après le plasma, l'angle de contact évolue très rapidement, passant de valeurs $<5^\circ$ à $\sim 60^\circ$ et la réponse devient plus hétérogène, comme le montrent les écart-types plus importants. Puis, après quelques jours, les valeurs évoluent progressivement vers un comportement plus hydrophobe, proche du PDMS natif mais la surface ne revient jamais totalement à son état initial. Le plasma d'oxygène provoque une altération durable de la surface. Dans le cadre de la silanisation, la surface activée par plasma doit donc être utilisée le plus rapidement possible pour la silanisation, dans les minutes qui suivent son traitement.

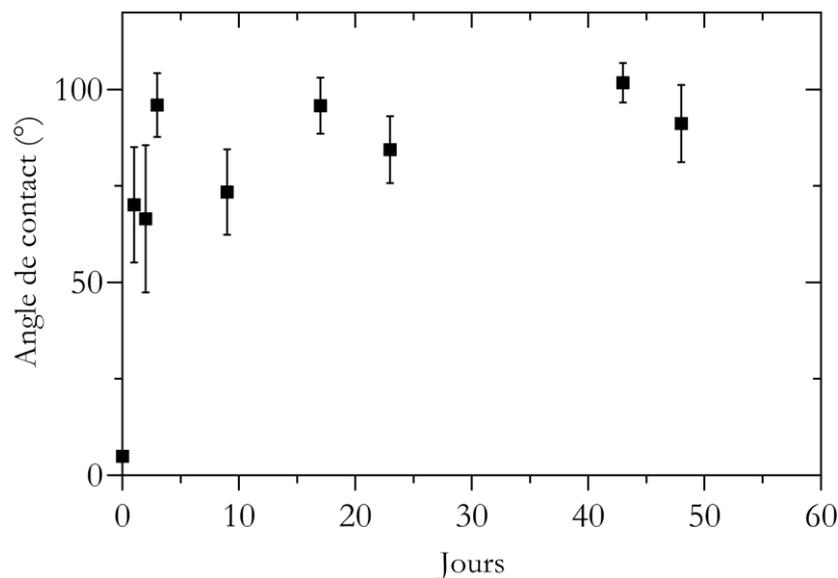


Figure 2 - 8. Évolution dans le temps des angles de contact d'échantillons de PDMS oxydés par plasma d'oxygène. Les points représentés n'appartiennent pas tous au même échantillon, plusieurs mesures sur des échantillons de vieillissements différents ont été rassemblées.

Après réaction avec l'APTES, la mouillabilité de la surface est alors plus complexe à évaluer car la conformation des chaînes d'APTES en surface du PDMS est très variable [18,24] et les mécanismes de formation des couches de silanes encore mal compris [25]. Aussi, la surface devient moins hydrophile du fait de la présence des chaînes carbonées du silane, mais la présence des fonctions amines plus hydrophiles favorisent aussi la mouillabilité de la surface. De même, le retour à l'hydrophobicité naturelle du PDMS après oxydation implique une possible dégradation dans le temps de l'état de surface du polymère avec la migration de monomères non polymérisés ou l'engloutissement de certaines fonctions de surface dans le volume du matériau [26]. Ces différents phénomènes ont ainsi pour effet d'affecter la qualité de la silanisation en surface et donc d'entraîner des variations de l'angle de contact, tant le long de la surface d'un échantillon qu'entre plusieurs échantillons. Ces phénomènes sont représentés sur la Figure 2 - 9 par les barres d'erreurs sur les mesures de mouillabilité des surfaces de PDMS silanisées selon différentes conditions réactionnelles.

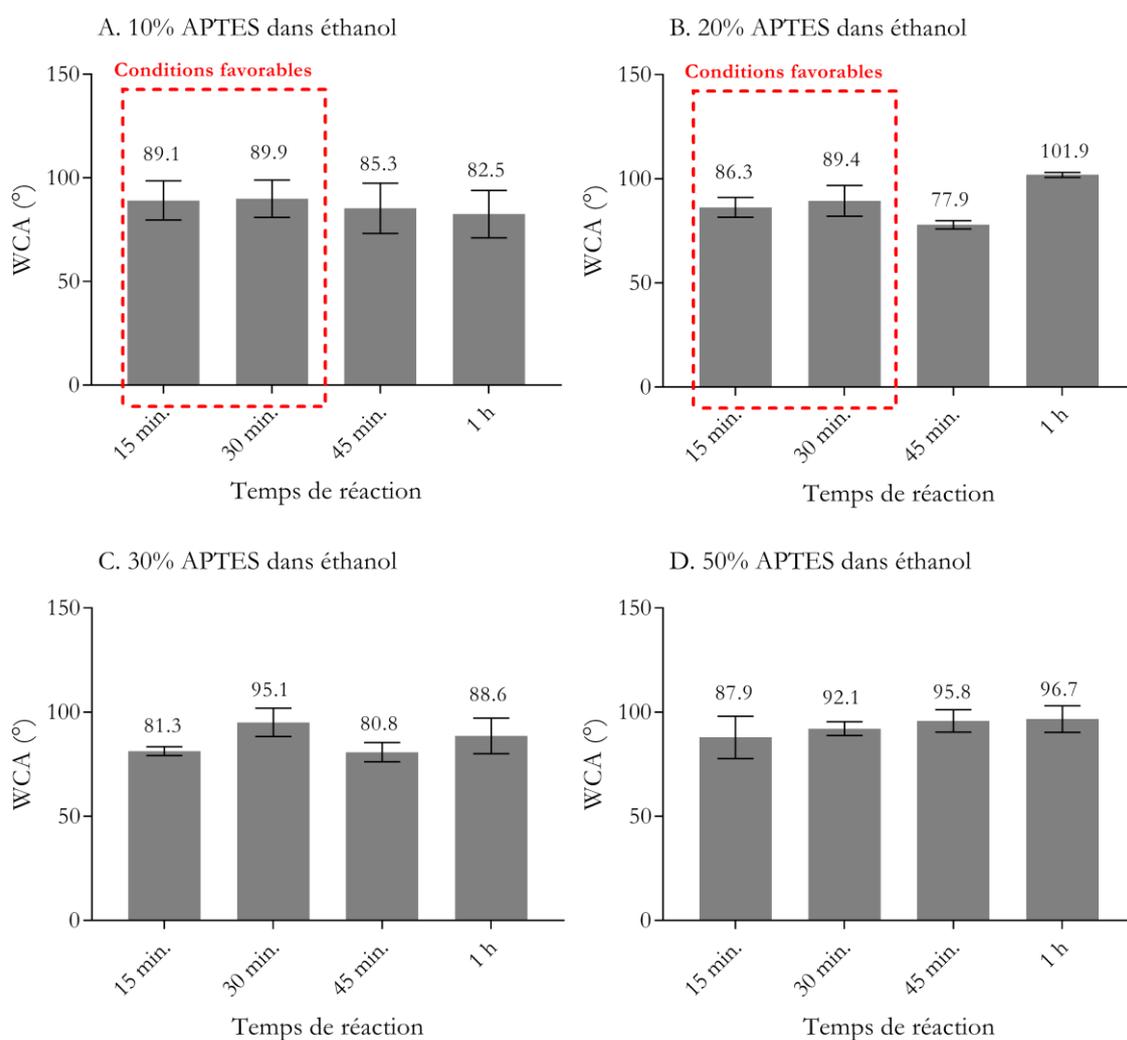


Figure 2 - 9. Evolution de l'angle de contact des surfaces de PDMS silanisées en fonction de la concentration d'APTES et du temps de réaction

Nous pouvons remarquer sur la Figure 2 - 9 que les modifications les plus significatives de l'angle de contact des surfaces de PDMS par rapport au PDMS natif surviennent pour des concentrations inférieures à 30%. De même, les temps de réaction les plus courts (<45 min.) résultent également en une modification de la mouillabilité plus importantes par rapport au PDMS natif. Une surface dont la mouillabilité s'approche de l'hydrophobicité (> 90°) peut indiquer deux choses : soit la silanisation n'a pas eu lieu et l'hydrophobicité native du PDMS se manifeste, soit la silanisation a été de mauvaise qualité, les groupements amines ne sont pas assez nombreux et leur contribution à l'hydrophilicité de la surface n'est pas suffisante.

Une silanisation de mauvaise qualité peut s'expliquer par une mauvaise activation de la surface ou une dégradation du greffage des silanes en surface par la polymérisation incontrôlée des molécules d'APTES en raison d'une trop forte concentration en silane ou de temps réactionnels prolongés. En effet, s'il y a un excédent de molécules d'APTES disponibles par rapport aux sites de greffage accessibles en surface ou que les temps de réaction laissent la possibilité à l'APTES de réagir davantage avec les chaînes déjà greffées ou en solution, le greffage est moins contrôlé et des agrégats peuvent se former en certains points de la surface. Aussi, les changements les plus significatifs de la mouillabilité par rapport au PDMS natif vers un caractère plus hydrophile de la surface (<90°) ont été obtenus pour des temps courts (<30 minutes) et des concentrations plus faibles en APTES (<20%).

Des valeurs similaires d'angle de contact ont été mesurées dans la littérature pour des surfaces de PDMS silanisées avec de l'APTES : Zargar *et al* [7] ont obtenus $77 \pm 2^\circ$, Khodakov *et al* [5] $83.9 \pm 3.3^\circ$, Beal *et al* [6] $105 \pm 1^\circ$, Siddique *et al* $66 \pm 2.4^\circ$ et Yu *et al* [11] 66.97° . Il en résulte des angles de contact variables entre 60 et 90° en fonction des conditions réactionnelles, du solvant utilisé, de la morphologie de la surface de PDMS, ... Dans le cadre de cette thèse, des variations dans la qualité du plasma et des conditions de silanisation ont également fortement influencé les valeurs d'angle de contact pour des concentrations en APTES et des temps de réaction identiques. Une stabilisation des conditions de préparation des échantillons ainsi que de l'environnement réactionnel en salle blanche ont permis d'améliorer la qualité des réactions et de diminuer davantage les valeurs d'angle de contact de $\sim 85^\circ$ à 60° après silanisation.

Bien que l'angle de contact permette déjà de définir une tendance sur les conditions réactionnelles les plus favorables (<45 minutes, $\leq 20\%$ d'APTES), cette technique seule ne suffit pas pour les confirmer. Aussi, la spectroscopie EDX a permis d'étudier l'évolution des éléments présents en surface du PDMS silanisés afin de consolider ces observations.

2.2.1.2. Étude élémentaire des surfaces silanisées par spectroscopie EDX

Nous avons abordé dans la partie 1.3.2 l'analyse élémentaire du PDMS natif par mesure EDX. Ce spectre présente notamment deux pics : un pour le carbone et un pour l'oxygène. Le pic du silicium était absent du fait d'un potentiel écrantage de cet élément par les groupements méthyles environnant.

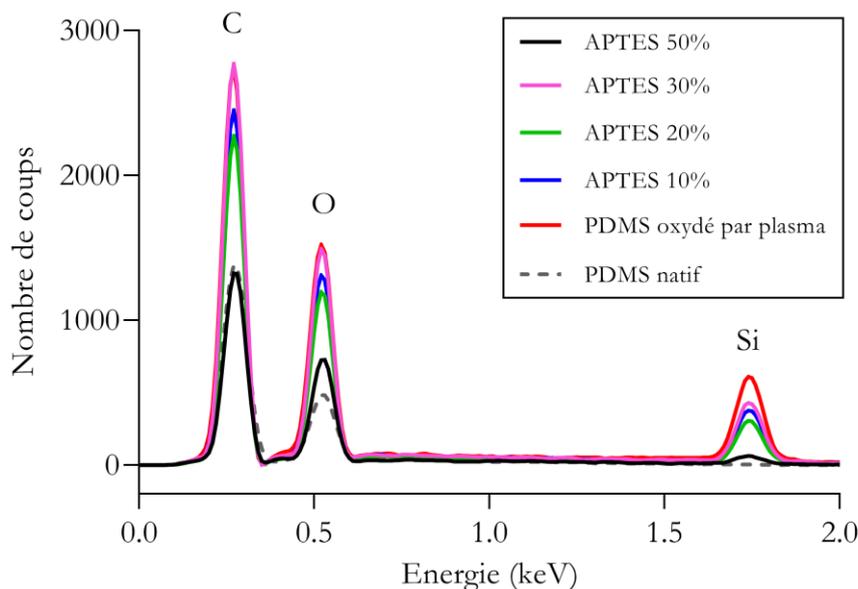


Figure 2 - 10. Spectres d'analyse EDX des surfaces de PDMS natif et silanisées

Pour l'étude de la silanisation, la difficulté d'une analyse élémentaire réside dans l'abondance des mêmes éléments dans les deux matrices à sonder : le PDMS est fait d'atomes de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et de silicium, tout comme l'APTES, bien que ce dernier présente de l'azote provenant des groupements amines. Cependant, la résolution spectrale de l'EDX ne permet pas d'identifier l'azote parmi une abondance de carbone et d'oxygène (dont les énergies de couches électroniques sont très proches du fait de numéros atomiques voisins). De plus, il est nécessaire de travailler à faible tension d'observation ($< 5\text{kV}$) pour éviter de charger la surface, le PDMS étant un diélectrique. Cela limite la détection d'éléments présents en trace comme l'azote. Celui-ci serait essentiellement présent dans les quelques premiers nanomètres de la surface, mais la présence de l'azote seul ne pourrait confirmer qu'il appartienne bien à l'APTES et non pas à une contamination extérieure.

La Figure 2 - 10 montre les différents spectres obtenus pour des échantillons de PDMS silanisés avec différentes concentrations d'APTES et ainsi que des échantillons contrôles non silanisés. Nous pouvons y distinguer 3 pics correspondant aux atomes de carbone, oxygène et silicium.

Pour évaluer la qualité de la silanisation, nous avons étudié le rapport Si/C du nombre de coups obtenus pour le silicium, sur ceux obtenus pour le carbone. Comme nous l'avons vu dans le cas du PDMS natif, le silicium n'est pas détecté par la sonde EDX et le rapport Si/C est donc nul. En revanche, une fois les groupements méthyles retirés par le plasma, les phénomènes d'écrantage des électrons incidents diminuent et la contribution du silicium augmente.

Après greffage de l'APTES, celui-ci apporte majoritairement du carbone (9 atomes de carbone par molécules pour un atome de silicium) ; ce qui contribue en une baisse modérée du rapport Si/C. En fonction des conditions de silanisation, l'apport en molécules de silane varie et le rapport Si/C évolue ; ce qui en fait un bon indicateur des modifications subies par la surface de PDMS, comme en témoigne la Figure 2 - 11 ci-dessous.

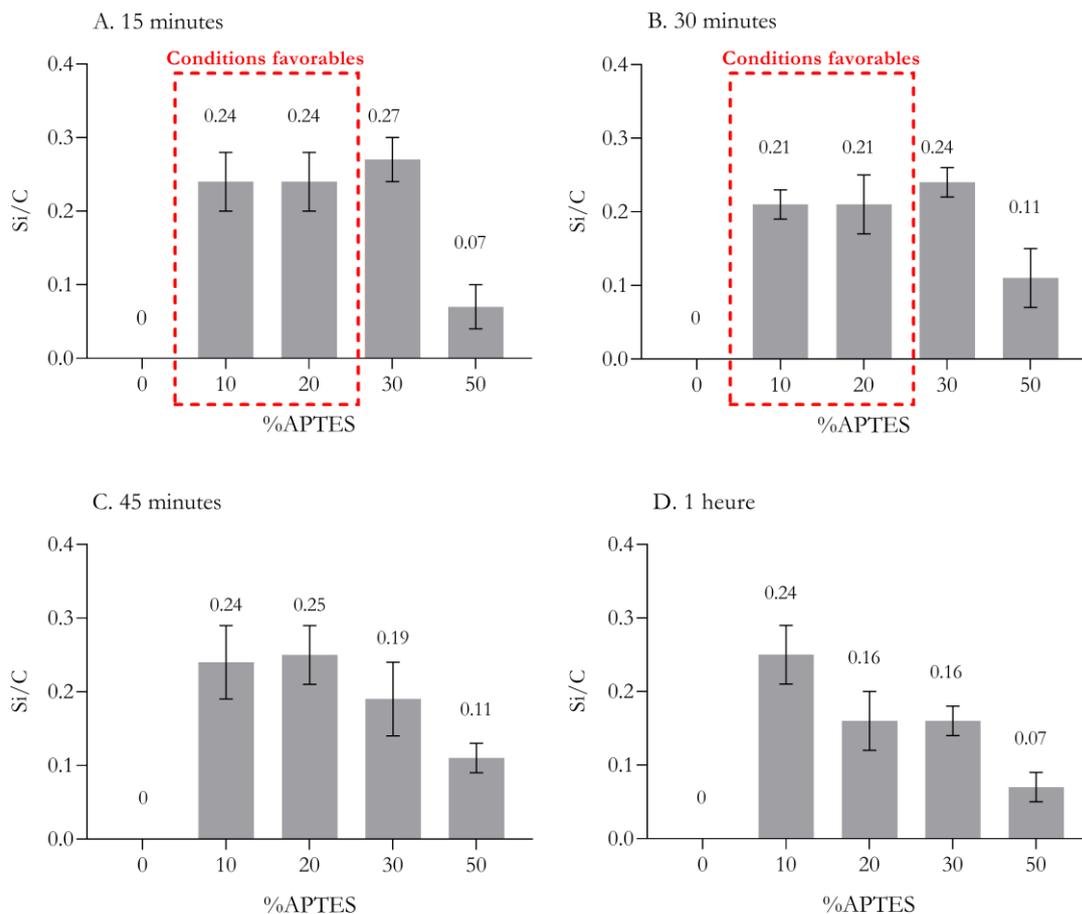


Figure 2 - 11. Évolution du rapport Si/C en analyse EDX en fonction des conditions de silanisation du PDMS par l'APTES

Nous pouvons observer sur la Figure 2 - 11 une évolution du rapport Si/C en fonction des conditions réactionnelles de silanisation. Pour des concentrations trop importantes en APTES (>30%), le rapport Si/C diminue de ~ 0.24 pour les temps courts et concentrations faibles à des valeurs inférieures à 0.11 pour les temps réactionnels les plus longs. Cela peut s'expliquer par les phénomènes de polymérisation incontrôlée et agrégation des silanes à la surface du PDMS. Le signal du silicium est noyé dans les chaînes carbonées entremêlées et le rapport Si/C chute.

Des rapports Si/C plus stables sont obtenus pour les conditions réactionnelles de 15 à 45 minutes et des concentrations de 10 à 30%. Cependant, des temps trop courts de réactions (<15 minutes) paraissent insuffisants pour permettre aux molécules de se lier correctement à la surface, avec le risque d'avoir une couche de silane faiblement liée à la surface par liaisons de Van der Waals ou hydrogènes [27].

Par conséquent, les conditions permettant d'assurer un greffage covalent des molécules de silanes sans risquer une agrégation en surface convergent vers 20% d'APTES et 30 minutes de réaction.

Conclusion intermédiaire de la partie 2.2.1

Pour résumer, les analyses de la mouillabilité et de la composition élémentaire des surfaces de PDMS silanisées en comparaison avec le PDMS natif ont permis de mettre en évidence des conditions favorables à la formation d'une couche de silanes en surface. Les conditions entraînant une dégradation de la surface par des phénomènes d'agrégation des silanes ont été identifiées pour des concentrations en APTES supérieures à 30 % et des temps de réaction prolongés (> 30 minutes). Les conditions retenues pour la suite de l'étude sont donc une concentration en APTES de 20 % dans l'éthanol et une durée de silanisation de 30 minutes. Il apparaît maintenant nécessaire d'approfondir l'état de surface du PDMS silanisé dans ces conditions afin de stabiliser le protocole de caractérisation permettant le suivi des échantillons. De même, il reste également à valider la présence et la réactivité des fonctions amines en surface en vue du greffage des anticorps.

2.2.2. Évaluation biochimique des conditions optimisées pour la silanisation du PDMS

Une étude approfondie des conditions de silanisation sélectionnées (APTES 20%, 30 minutes) est nécessaire pour assurer la qualité de la surface obtenue en termes d'homogénéité et réactivité. En effet, la perspective de l'intégration en microfluidique par assemblage de la surface avec des canaux de PDMS nécessite une silanisation suffisamment homogène pour garantir une reproductibilité des analyses entre les différents canaux d'une même puce. De même, la réactivité de la surface reste à vérifier pour l'application visée, c'est-à-dire le greffage des anticorps sur la surface. Pour cela, il faut confirmer la présence des fonctions amines et s'assurer de leur réactivité pour le greffage des immunocomplexes à base de TNF- α . Dans cet objectif, les méthodes de caractérisation ont parfois été adaptées et complétées pour extraire davantage de données quantitatives de la surface.

2.2.2.1. Étude de la mouillabilité des surfaces silanisées au cours du temps

L'étude de la mouillabilité des surfaces par angle de contact a ainsi permis d'étudier l'évolution des surfaces silanisées au cours du temps pendant leur stockage. La Figure 2 - 12 montre l'évolution de l'angle de contact sur la surface de plusieurs échantillons sur 45 jours. Il est important de noter qu'il s'agit d'un regroupement de données de plusieurs échantillons à différents stades de vieillissement appartenant à des lots différents et non un seul échantillon suivi sur 45 jours. Les échantillons étaient conservés à 4°C sous atmosphère d'azote.

L'évolution de la mouillabilité peut être découpée en deux phases : une première phase transitoire de changement plus rapide de la mouillabilité, passant de 60° à 85° en 15 jours, puis une phase de stabilisation où la mouillabilité n'évolue plus et se maintient entre 85° et 90° jusqu'à 45 jours après silanisation. La surface reste donc hydrophile et conserve une certaine homogénéité symbolisée par des écarts-types relativement faibles.

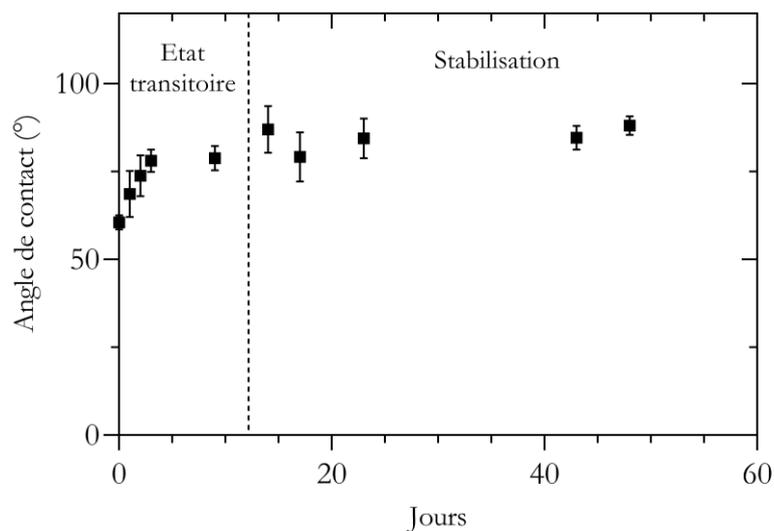


Figure 2 - 12. Évolution au cours du temps de l'angle de contact de surfaces de PDMS silanisées avec 20% d'APTES dans l'éthanol pendant 30 minutes

Ainsi, la silanisation serait encore stable sur 45 jours mais la qualité de l'échantillon est maximale dans les quelques jours suivant la réaction. Les réactions de greffage biologique doivent donc être réalisées sur des échantillons fraîchement silanisés dans la mesure du possible pour garantir un bon rendement de greffage. Pour les expériences de greffage menées dans la suite de cette thèse, les réactions sont toujours menées 24h après la silanisation.

2.2.2.2. Étude de composition élémentaire des surfaces silanisées par EDX en angle rasant

L'étude des surfaces silanisées par spectroscopie EDX est sans doute la technique de caractérisation qui a demandé le plus d'optimisation car particulièrement sensible à une variation des conditions de mesure. Dans l'étude préliminaire, les échantillons étaient observés à une tension de 3 kV et sans rotation du porte-échantillon. L'EDX a une profondeur d'analyse de quelques microns, comme expliqué dans les détails de la méthode en annexe. Afin d'être plus sensible aux phénomènes de surface, nous avons entrepris d'étudier l'incidence de l'angle d'attaque de la sonde avec l'échantillon (le "tilt"). Pour cela, nous avons effectué des mesures à 5 kV (afin d'augmenter la réponse de la surface) pour un angle de 0°, 30° et 45° avec l'horizontal (voir Figure 2 - 13). L'utilisation de l'incidence rasante de la sonde permet de modifier le cône de diffusion des électrons dans le matériau, favorisant une diffusion et une détection en surface plutôt qu'en profondeur [28].

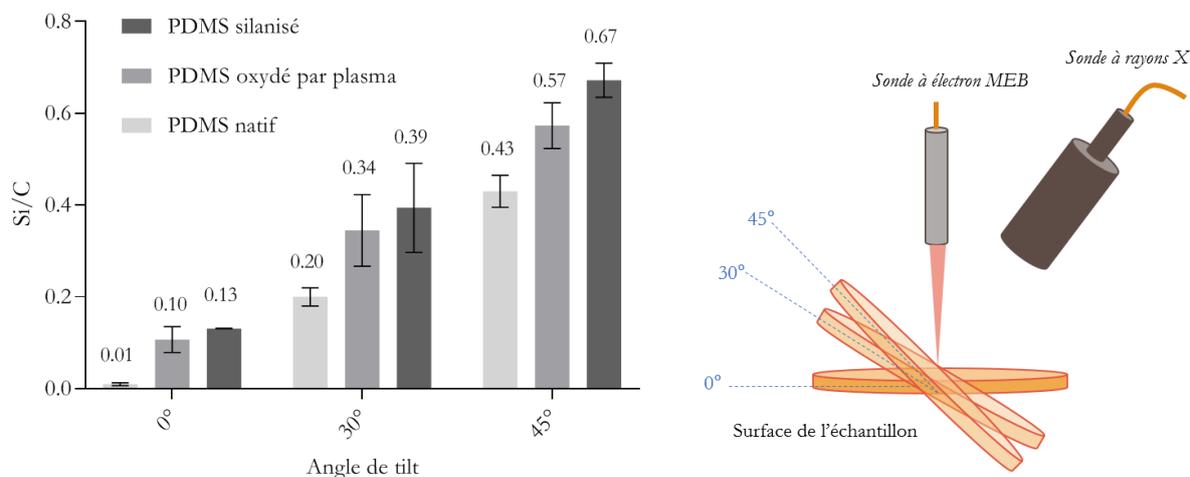


Figure 2 - 13. Étude de l'influence du tilt en spectroscopie EDX sur le rapport Si/C des échantillons de PDMS natif, oxydés et silanisés.

Ainsi, en modifiant l'angle de tilt, nous observons une augmentation du rapport Si/C pour tous les échantillons analysés : le rapport est multiplié d'un facteur 5 en passant d'un tilt 0 à 45° (0.13 pour le PDMS silanisé à 0° à 0.67 pour le PDMS silanisé à 45°). La sensibilité accrue à 45° permet ainsi une meilleure discrimination des différents types d'échantillons. Par ailleurs, le phénomène d'écrantage du silicium par les groupements méthyles observés sur le PDMS natif n'apparaît plus en tiltant l'échantillon : le rapport Si/C du PDMS natif atteint 0.43 à 45° contre 0.01 à 0°. Cela permet une analyse plus représentative des éléments présents à la surface de l'échantillon.

Cette étude plus approfondie en EDX a donc permis de développer une méthode d'analyse plus sensible mais aussi de confirmer la modification du PDMS par la silanisation, avec une hausse significative (+ 55%) du rapport Si/C par rapport au PDMS natif. Cette méthode EDX par angle rasant a ensuite été adoptée pour l'ensemble des analyses des échantillons silanisés dans les conditions retenues dans la partie 2.1.1. Il a notamment permis avec l'angle de contact d'évaluer l'homogénéité et la répétabilité de la silanisation dans une étude statistique sur plusieurs lots d'échantillons dans la partie suivante.

2.2.2.3. Étude de l'homogénéité et de la répétabilité de la silanisation par angle de contact et analyse EDX

Afin d'étudier la qualité du protocole de silanisation retenue (APTES 20%, 30 minutes) en termes d'homogénéité et répétabilité, une étude statistique a été menée sur 3 lots de 10 échantillons de 1 cm² de PDMS silanisés. Chaque lot correspond à une boîte en verre utilisée pour la silanisation de 10 échantillons en parallèle. Les 3 boîtes sont préparées et silanisées dans les mêmes conditions au même moment, selon le protocole décrit dans la partie 2.2.1.

Tableau 2 - 2. Étude statistique de l'homogénéité et de la répétabilité de la silanisation par angle de contact (WCA) et EDX sur 3 lots d'échantillons de 10 surfaces de PDMS de 1 cm²

Angle de contact	N° lot	Moyenne WCA ° (n=10)	RSD ¹ intra lot	Moyenne WCA°(n=30)	RSD inter lot
	#1	69.3 ± 6.9	9.9%		
	#2	66.7 ± 2.4	3.6%		
	#3	69.6 ± 6.5	9.4%		
EDX	N° lot	Moyenne Si/C (n=3)	RSD ¹ intra lot	Moyenne Si/C (n=9)	RSD inter lot
	#1	0.77 ± 0.05	6.4%		
	#2	0.74 ± 0.10	14.2%		
	#3	0.73 ± 0.11	15.0%		

¹RSD = *Relative Standard Deviation*, écart type relatif (écart-type/moyenne)

Les 3 lots de 10 échantillons sont ensuite caractérisés par angle de contact afin d'évaluer l'homogénéité de chaque échantillon, la variabilité entre les échantillons d'une même boîte (intra-lot) et entre les échantillons de plusieurs boîtes (inter-lot). La même étude est réalisée en EDX sur 3 échantillons seulement par lot car la mesure EDX endommage en partie la surface du fait des conditions du vide et du bombardement avec le faisceau d'électrons. Une partie des échantillons étant ensuite réservée pour des mesures AFM et un greffage d'anticorps, l'intégrité de certains échantillons devait être assurée.

Les résultats obtenus pour les deux méthodes sont résumés dans le Tableau 2 - 2. Pour l'étude de la mouillabilité par angle de contact sur les 30 échantillons, la variation intra et inter lot reste inférieure à 10%. Pour l'étude EDX sur 3 échantillons par lot, la variation intra et inter lot reste inférieure à 15%. L'EDX étant particulièrement sensible à des fluctuations des conditions d'observations, cette variabilité reste tout à fait acceptable.

Ainsi, cette étude montre que les conditions de silanisation sélectionnées pour le PDMS permettent d'obtenir des surfaces homogènes et répétables entre elles. Les analyses physico-chimiques utilisées sont stables et fournissent des valeurs de références permettant le suivi des échantillons tout au long d'un processus de fonctionnalisation de surface du PDMS.

Il reste désormais à démontrer la présence des fonctions amines disponibles en surface pour les conditions sélectionnées au travers de deux techniques : la spectrométrie FTIR et la microscopie à fluorescence.

2.2.2.4. Étude de la structure chimique des surfaces silanisées par spectrométrie FTIR

Nous avons ainsi entrepris une étude des fonctions chimiques en surface des échantillons silanisés par spectroscopie FTIR. L'objectif consiste à caractériser la présence des groupements chimiques caractéristiques des silanes, comme les fonctions amines -NH₂ ou les liaisons siloxanes Si-O-Si.

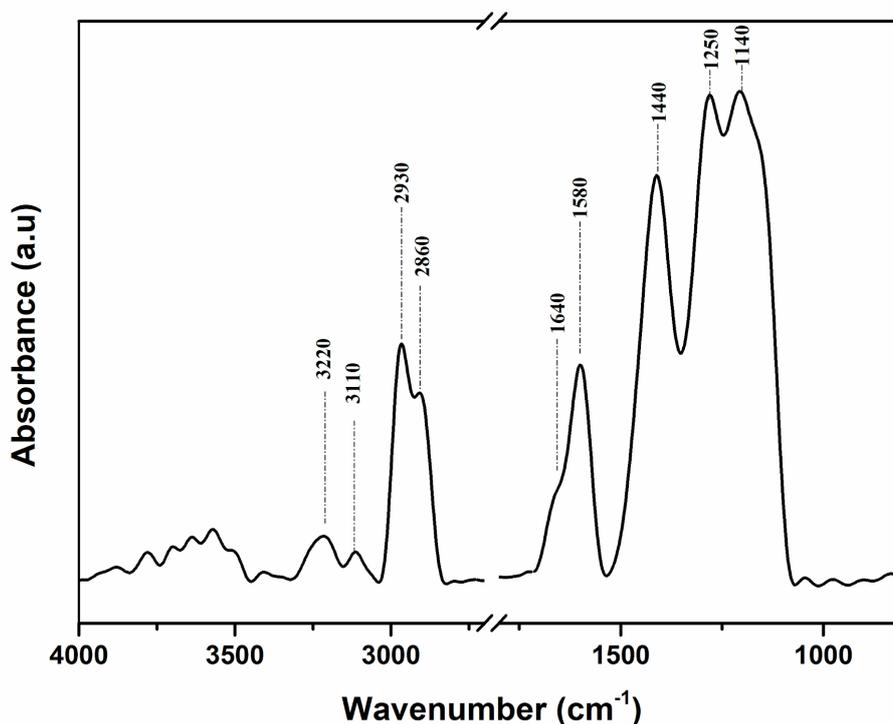


Figure 2 - 14. Spectre FTIR en absorbance du PDMS silanisé après soustraction du signal de l'échantillon de référence de PDMS oxydé

Ici, l'échantillon de référence est une surface de PDMS oxydée par plasma O_2 . En effet, le PDMS natif est trop éloigné en termes de structure du substrat d'accueil des silanes, notamment par l'absence de fonctions silanols Si-OH indispensables au greffage de l'APTES.

La Figure 2 - 14 représente le spectre obtenu pour le PDMS silanisé dans les conditions sélectionnées auquel le spectre de l'échantillon de référence de PDMS oxydé a été soustrait afin de ne faire ressortir que les pics caractéristiques de la silanisation.

A partir de ce spectre, nous pouvons déduire la présence de différentes fonction chimiques caractéristiques du PDMS silanisé [29] :

- 1100 à 1250 cm^{-1} : Si-O-Si, reflétant la formation des liaisons siloxanes entre l'APTES et le PDMS [6,7,30] ;
- 1140 cm^{-1} : Si-O-C, issu de groupements éthoxy de molécules d'APTES non réagies [7] et formation de Si-O-Si par condensation des molécules non réagies avec l'eau environnante [31] ;
- 1440 cm^{-1} : qui est attribué soit aux déformations des sels d'amine-bicarbonate formés entre les amines et le CO_2 atmosphérique, soit aux déformations des liaisons Si- CH_2 du silane [6,30]
- 1580 cm^{-1} : vibration de cisaillement de NH_2 , soutenant la présence des amines terminaux sur la chaîne d'APTES ;
- 1640 cm^{-1} : déformation asymétrique de $-NH_3^+$ issue de la protonation des amines en contact avec l'air ;
- 2860 et 2930 cm^{-1} : élongation symétrique et asymétrique des groupements $-CH_x$ des chaînes carbonées de l'APTES ;

- 3100 à 3300 cm^{-1} : faible vibration d'élongation symétrique et asymétrique de fonction -NH ;
- 3600 cm^{-1} : groupements hydroxyles et molécules d'eau adsorbées liées par liaisons hydrogènes.

Ces pics caractéristiques ont également été identifiés par Zargar *et al*[7], Nourmohammadi *et al* [30], Beal *et al* [6] sur du PDMS silanisé avec l'APTES. Pasternak *et al* [31] et Kim *et al* [32] ont également noté ces pics caractéristiques de l'APTES sur des surfaces de silicium.

Ainsi, la spectroscopie FTIR permet de valider la présence de fonctions chimiques caractéristiques de l'APTES, présentes uniquement sur les échantillons silanisés, validant le greffage des silanes sur le PDMS. La présence des fonctions amines est aussi confirmée mais leur réactivité reste à démontrer. Pour cela, une méthode de caractérisation utilisant un marqueur fluorescent a été développée dans la partie suivante.

2.2.2.5. Étude de la réactivité des fonctions amines des surfaces silanisées par la fluorescamine en microscopie à fluorescence

Afin de garantir la spécificité et la réactivité des groupements amines en surface, une étude qualitative a été menée par détection des amines primaires par la fluorescamine. La fluorescamine est un fluorophore qui réagit spécifiquement et rapidement avec les amines primaires, et forme une espèce fluorescente à 385 nm et émettant à 475 nm [33].

La solution de fluorescamine est préparée en diluant 1 mg de fluorescamine dans 500 μL d'acétone. Puis elle est diluée 10 fois dans du PBS (1X). Les surfaces de PDMS silanisées sont ensuite immergées pendant 1 minute dans la solution puis rincées avec du PBS (1X), séchées et observées au microscope à fluorescence à 385 nm.

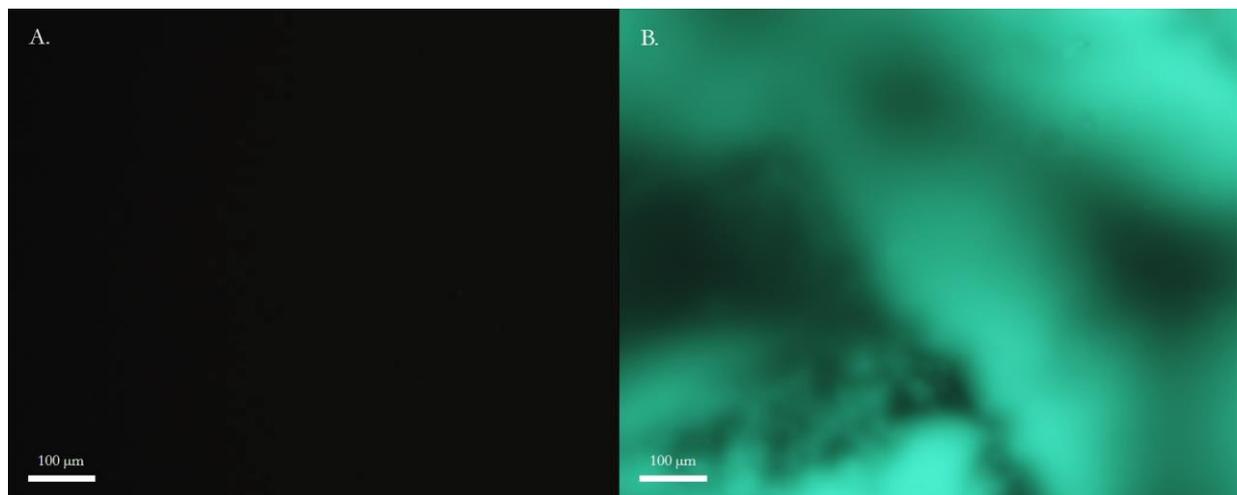


Figure 2 - 15. Photographie de surface de PDMS natif (A) et silanisé (B) en présence de fluorescamine. Exc. 385 nm, Em. 475 nm, grossissement x10, 300 ms.

Par rapport à la surface non-silanisée, nous observons sur la Figure 2 - 15 un signal fluorescent plus intense : 75.31 ± 11.3 u.a contre 13.06 ± 0.43 u.a pour les surfaces de contrôle, validant la présence d'amines primaires en surface du PDMS silanisé. Des variations de l'intensité fluorescente le long de la surface s'expliquent par la disponibilité variable des amines en fonction de la conformation des silanes en surface. Plusieurs paramètres peuvent en effet influencer la conformation finale : la topologie du substrat, la concentration du silane lors de la réaction, le temps de réaction, le solvant utilisé, des étapes supplémentaires de traitement, etc. Dans notre cas, nous pouvons supposer une multicouche de silanes, provoquant une variation de la disponibilité des amines primaires en surface, avec certains groupements amines faiblement liés à d'autres molécules par liaisons hydrogènes ou interactions électrostatiques. Par ailleurs, la plasticité du PDMS peut aussi entraîner une variation de la réponse fluorescente, comme expliqué dans les mesures de mouillabilité dans la partie 2.2.1.

La présence des amines étant confirmée, il s'agit désormais de vérifier qu'elles sont disponibles pour les réactions de bioconjugaison avec les anticorps. Pour cela, un protocole de greffage d'IgG modèle a été développé et la répartition des anticorps sur la surface caractérisée par microscopie à fluorescence.

2.2.2.6. Étude du greffage d'anticorps modèle sur les surfaces silanisées en microscopie à fluorescence

Afin de rendre le PDMS biosensible, la réactivité des surfaces silanisées avec des molécules d'anticorps est nécessaire. Pour valider cette étape, nous avons choisi des IgG modèles de souris. La surface de PDMS silanisé présentant des amines primaires disponibles, il est possible d'y conjuguer de nombreuses entités biologiques différentes présentant des groupements amines et/ou carboxyliques (protéines, enzymes, ADN, ARN, anticorps...). Comme expliqué dans le chapitre 1, il existe de nombreux réactifs de bioconjugaison disponibles en fonction des espèces à conjuguer et du milieu de réaction [34].

Dans notre cas, la réaction par EDC/S-NHS était déjà bien maîtrisée et connue au laboratoire ; ce qui a orienté notre choix. Elle est également bien connue des biochimistes, très couramment utilisée et facile à mettre en œuvre. Elle nécessite peu d'étapes, des réactifs peu onéreux et des conditions compatibles avec les molécules impliquées (en termes de pH, solvant et température par exemple). Cependant, nous pouvons lui reprocher son manque de spécificité et donc l'orientation aléatoire des anticorps lorsqu'ils sont greffés sur la surface silanisée.

En effet, la conjugaison entre l'APTES en surface du PDMS et les anticorps se fait par l'intermédiaire d'une liaison amide créée à partir des acides aminés Aspartate et Glutamate répartis sur l'anticorps et l'EDC, comme expliqué dans le chapitre 1 et illustrée par la Figure 2 - 16 ci-dessous.

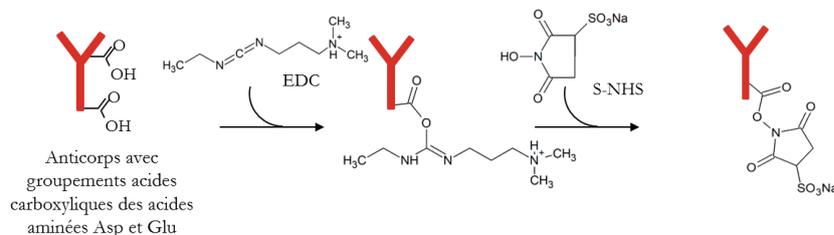
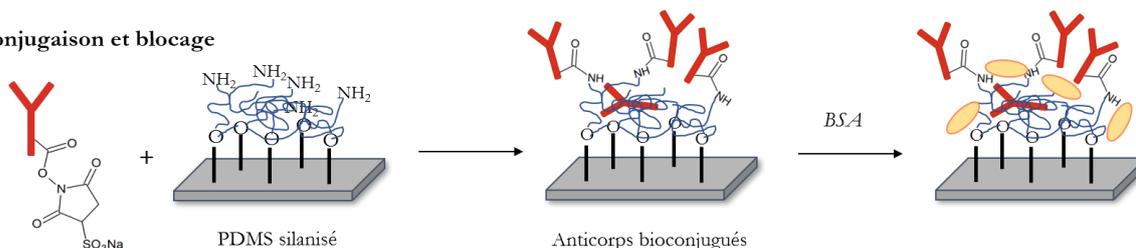
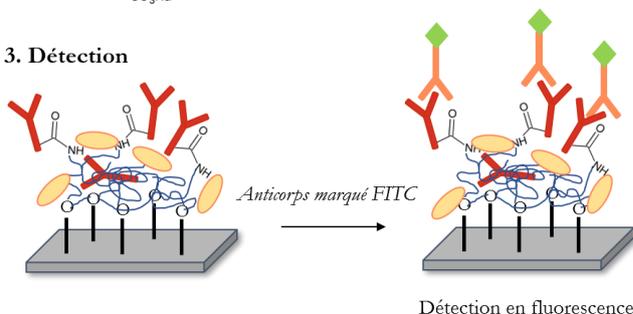
1. Activation**2. Conjugaison et blocage****3. Détection**

Figure 2 - 16. Schéma des étapes de greffage et de détection des IgG modèles sur le PDMS silanisé

Afin de vérifier la réactivité de la surface avec les IgG modèles, un greffage d'IgG de souris a été réalisé sur 3 lots de surfaces de PDMS silanisés (voir échantillons partie 2.2.2.3) et comparé aux surfaces de PDMS natif (c'est-à-dire non silanisé, non oxydé) avec 3 répliques par surface. Le protocole utilisé est décrit en annexe.

Les surfaces de PDMS silanisés et de PDMS natifs sont observées au microscope fluorescent à 475 nm. Un protocole particulier de quantification a été suivi afin de comparer les deux types de surface et évaluer la dispersion relative du signal fluorescent sur une même surface. Pour cela, cinq images par réplique ont été enregistrées puis 4 zones d'intérêt de 225 x 225 μm ont été définies pour chaque image. La fluorescence de chaque zone d'intérêt a été quantifiée puis la moyenne des 4 zones et l'écart-type correspondant ont été calculés.

Le PDMS silanisé présente en moyenne une réponse fluorescente de 65.36 ± 1.81 u.a (RSD 2.8%) contre 54.39 ± 2.72 u.a (RSD 5.0%) pour le PDMS natif. Ainsi, le signal des surfaces silanisées est en moyenne 20% plus intense que les surfaces de PDMS natif et avec une variabilité de 2.8% contre 5.0% pour le PDMS natif. Le greffage des anticorps est donc validé sur les surfaces silanisées, offrant de meilleures performances en termes d'homogénéité et sensibilité par rapport au PDMS natif sur lequel les anticorps ne sont qu'adsorbés par interactions non-covalentes.

Ces différences de répartition des anticorps sur les deux types de surface sont particulièrement visibles sur les mesures d'AFM dans la partie suivante.

2.2.2.7. Étude de la topologie des surfaces silanisées et greffées avec des anticorps par microscopie à force atomique (AFM)

Afin d'évaluer les changements topologiques occasionnés par la silanisation sur le PDMS et le greffage des anticorps, des mesures AFM ont été effectuées sur les deux types de surfaces et comparées au PDMS natif. Pour rappel, la surface de PDMS natif était particulièrement lisse avec une RMS de 1.01 nm.

La Figure 2 - 17 montre l'image AFM d'un échantillon de PDMS silanisé. Nous pouvons y observer une surface très proche du PDMS natif, lisse et homogène avec une rugosité légèrement plus élevée, s'expliquant par le greffage des chaînes de silanes. Aucun signe d'agrégation des silanes n'est visible.

Un échantillon de PDMS silanisé (20% APTES, 30 min.) et un échantillon de PDMS natif ont suivi le protocole de greffage d'IgG de souris identique à celui décrit précédemment dans la partie 2.2.2.6. Le protocole a été arrêté après la première étape de greffage, avant l'ajout de la BSA pour ne voir que l'effet de la première couche d'anticorps sur la topologie des échantillons. Les résultats sont présentés sur la Figure 2 - 18.

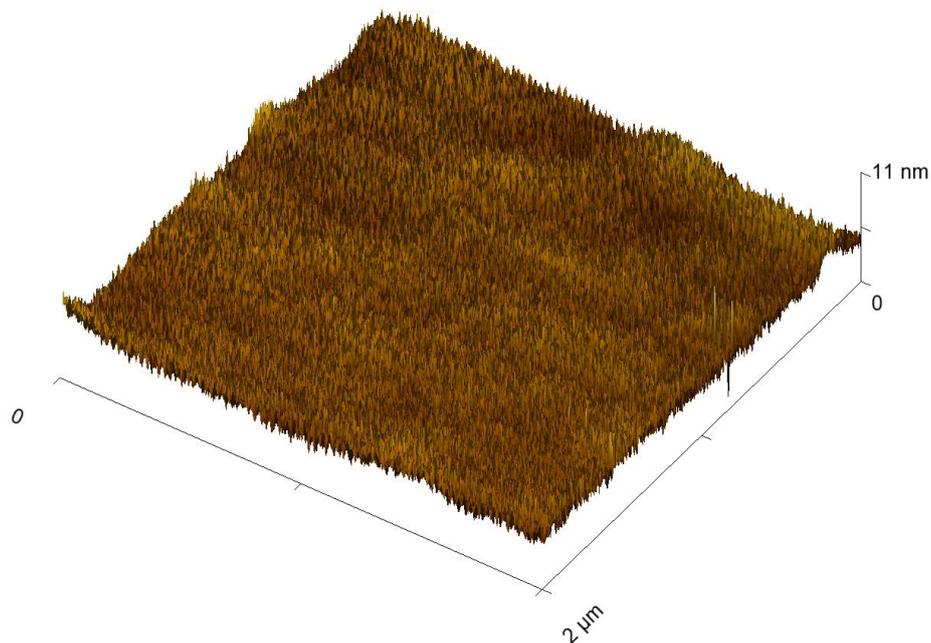


Figure 2 - 17. Mesure AFM sur un échantillon de PDMS silanisé avec 20% d'APTES dans l'éthanol pendant 30 minutes. RMS = 1.78 nm

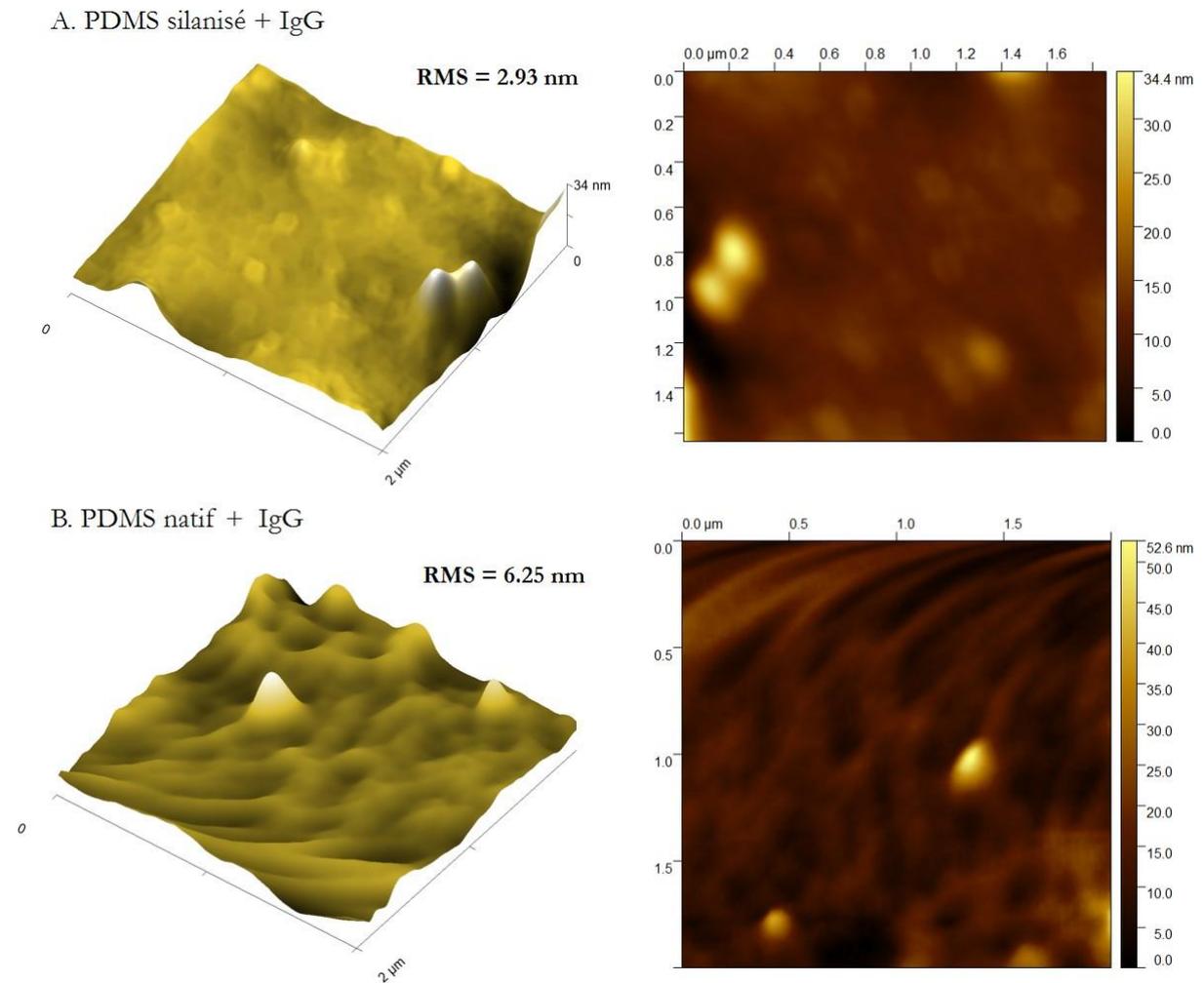


Figure 2 - 18. Mesures AFM sur des échantillons de PDMS silanisé greffés avec des IgG de souris (A) et PDMS natif en présence d'IgG de souris (B)

Le PDMS silanisé et greffé avec les IgG présente une rugosité supérieure au PDMS silanisé avec une RMS de 2.93 nm mais qui reste encore relativement faible. Cela témoigne d'une bonne répartition des anticorps sur la surface, guidée par la présence des silanes offrant des sites d'accroche préférentiels le long de la surface. La rugosité légèrement plus élevée par rapport au PDMS silanisé s'explique par quelques agrégats inévitables mais néanmoins peu fréquents.

En revanche le PDMS natif avec les IgG adsorbées présente une rugosité bien plus élevée de 6.25 nm, typique de phénomène d'agrégation et probablement d'adsorption des molécules dans le volume du PDMS. Ici, la forte capacité du PDMS à adsorber des protéines à sa surface est représentée, avec une distribution spatiale aléatoire et non contrôlée des anticorps.

Ainsi, la silanisation du PDMS semble conférer à la surface une capacité à greffer les anticorps de manière plus homogène, limitant l'agrégation et favorisant la formation d'une surface biofonctionnalisée stable.

Conclusion intermédiaire de la partie 2.2

Pour résumer les conclusions des deux études sur la silanisation du PDMS, une étude préalable des conditions de silanisation par angle de contact et spectroscopie EDX a permis de sélectionner les paramètres réactionnels les plus favorables pour la formation de couches de silane en surface du PDMS, sans provoquer d'agrégation du silane. Les conditions retenues sont une concentration en APTES de 20% dans l'éthanol et un temps réactionnel de 30 minutes.

Puis, une étude plus approfondie de ces conditions de silanisation a été réalisée en combinant plusieurs techniques de caractérisation physico-chimiques. Cette étude a permis de valider la présence de silanes stables en surface présentant des fonctions amines disponibles pour les réactions de bioconjugaison indispensable au greffage des anticorps. La signature d'une surface de PDMS silanisée avec 20% d'APTES dans l'éthanol pendant 30 minutes a ainsi pu être établie afin d'assurer un contrôle rapide de la qualité des surfaces fonctionnalisées produites pour les expériences suivantes. La répétabilité du protocole a également été évaluée par angle de contact et EDX avec une variabilité inférieure à 15% des propriétés de la surface entre plusieurs lots d'échantillons.

Finalement, des différences notables avec le PDMS natif ont pu être observées pour le greffage d'IgG modèle et quantifiées par fluorescence. Le PDMS silanisé présente de meilleures performances par rapport au PDMS natif avec une variation de 2.8% de l'intensité fluorescente sur la surface contre 5% pour le PDMS natif et une réponse 20% plus intense pour les surfaces silanisées. De même, les analyses topologiques par AFM montrent une plus grande homogénéité et stabilité des surfaces silanisées et greffées avec des anticorps que les surfaces de PDMS natif souffrant d'adsorption non spécifique et d'agrégation. L'ensemble de ces résultats conforte la stabilité et la qualité des surfaces préparées en vue du greffage d'anticorps anti-TNF- α pour l'immunodosage réalisé dans la partie suivante.

2.3. Greffage des anticorps anti-TNF- α sur les aminosilanes

Dans la partie précédente, nous avons validé le greffage d'IgG modèle sur le PDMS silanisé. Dans le but de réaliser le dispositif de détection de cytokine visé dans cette thèse, il est nécessaire de vérifier cette étape avec des anticorps dirigés contre le TNF- α . Une fois la première couche d'anticorps greffée, elle pourra être utilisée pour réaliser un immunodosage du TNF- α .

Cet immunodosage nécessite plusieurs étapes de greffage avec plusieurs couches d'anticorps. Nous adopterons ici l'immunodosage en sandwich présenté dans le chapitre 1 et schématisé sur la Figure 2 - 19, avec 3 couches d'anticorps :

- (i) une première couche d'anticorps, appelés anticorps de capture, permettant la capture de l'antigène ;
- (ii) une seconde couche d'anticorps, appelés anticorps primaires, permettant la détection de l'antigène capturé par l'anticorps de capture ;
- (iii) une troisième et dernière couche d'anticorps fluorescents, appelés anticorps secondaires, permettant la détection fluorescente du complexe préalablement formé.

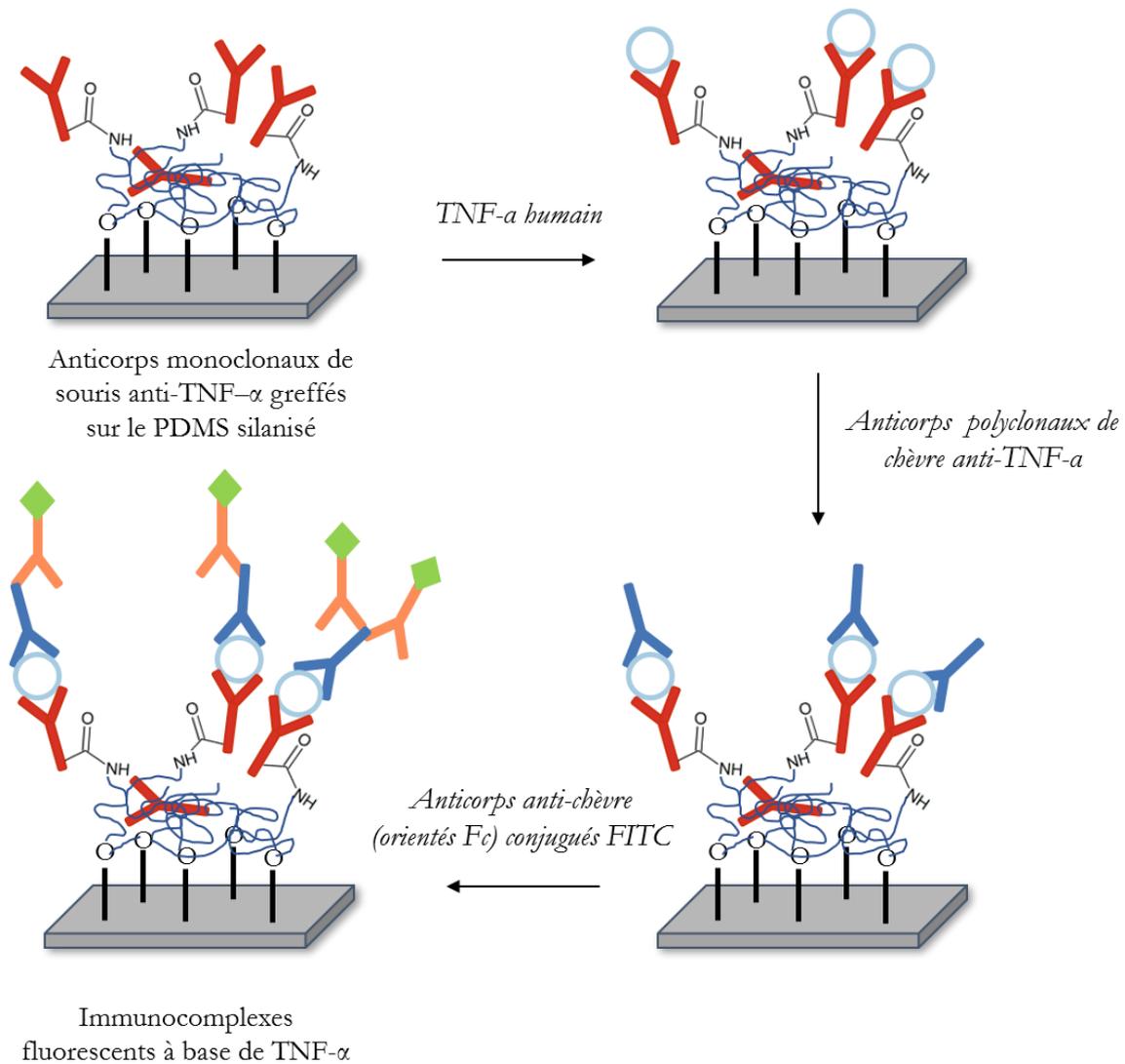


Figure 2 - 19. Schéma de l'immunosorpage du TNF- α humain sur le PDMS silanisé

Le choix de chaque anticorps aux différentes étapes de l'immunosorpage est important et va impacter la spécificité et la sensibilité de la détection [35,36].

La question se pose en particulier pour le choix du type d'anticorps pour l'anticorps de capture et l'anticorps primaire, entre des anticorps monoclonaux et polyclonaux. Les anticorps polyclonaux ont l'avantage d'être moins coûteux, capables de capturer un grand nombre d'antigènes du fait des multiples sites de reconnaissance sur l'antigène (épitope). Ils sont donc conseillés pour le développement de test de détection d'un antigène donné car ils augmentent les probabilités de capture de l'antigène dans l'échantillon. En revanche, ils sont produits dans un animal unique à un instant donné ; ainsi plusieurs lots d'anticorps n'auront pas forcément les mêmes populations d'anticorps polyclonaux, entraînant des irrégularités dans la détection sur plusieurs tests.

Les anticorps monoclonaux sont plus coûteux mais offrent une spécificité accrue car ils sont capables de détecter uniquement un seul site de l'antigène [37]. Ils sont donc conseillés dans les applications de quantification d'une protéine, minimisant les risques de faux-positifs et améliorant la sensibilité de la détection [38].

Il existe ensuite des protocoles d'immunosorpage utilisant des anticorps polyclonaux comme anticorps de capture et des anticorps monoclonaux comme anticorps primaire. L'inverse est aussi

possible, et l'usage exclusif d'anticorps polyclonaux est également courant.

Dans notre cas, nous avons choisi d'immobiliser un anticorps monoclonal de souris sur le PDMS silanisé afin d'augmenter la spécificité de la détection du TNF- α humain [38]. La *Bovine Serum Albumin* (BSA) est ensuite ajoutée afin de prévenir les interactions non spécifiques. L'anticorps primaire est polyclonal et peut ainsi s'adapter aux sites restant sur l'antigène, disponibles car non occupés par l'anticorps monoclonal. Enfin, l'anticorps secondaire marqué par un fluorophore (FITC) est dirigé contre le fragment Fc des anticorps primaires. Ceci permet de vérifier que les anticorps greffés sur la surface silanisée peuvent capturer l'antigène *via* le fragment Fab. Plus de détails sur les fragments d'anticorps sont donnés dans le chapitre 3 portant essentiellement sur le sujet. Par ailleurs, plusieurs anticorps secondaires pourraient potentiellement se fixer sur un seul anticorps primaire ; ce qui aurait pour effet d'amplifier le signal fluorescent détecté, comme illustré sur la dernière étape de la Figure 2 - 19.

2.3.1. Étude de la concentration de la couche d'anticorps de capture

Afin d'assurer une détection spécifique du TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisés (APTES 20%, 30 minutes), une étude de la concentration de greffage de la couche d'anticorps de capture a été menée. En effet, il est nécessaire de déterminer la concentration permettant de greffer un maximum d'anticorps sur les sites de greffage disponibles sur la surface silanisée, sans entraîner leur agrégation.

Pour cela, le même protocole de la partie 2.2.2.6 a été utilisé en adaptant les concentrations d'anticorps. Plusieurs concentrations d'anticorps de capture ont été étudiées entre 0 et 5 $\mu\text{g/mL}$. La solution d'anticorps de détection FITC anti-souris a été diluée à 1 :100.

Les surfaces sont ensuite observées au microscope fluorescent à 475 nm avec un grossissement x10 et un temps d'acquisition de 1500 ms. Les images correspondantes aux différentes concentrations d'anticorps sont présentées sur la Figure 2 - 20

La courbe de la réponse fluorescente de la surface de PDMS silanisé en fonction de la concentration en anticorps de capture est représentée en Figure 2 - 21. La réponse fluorescente du PDMS natif a été soustraite des intensités mesurées.

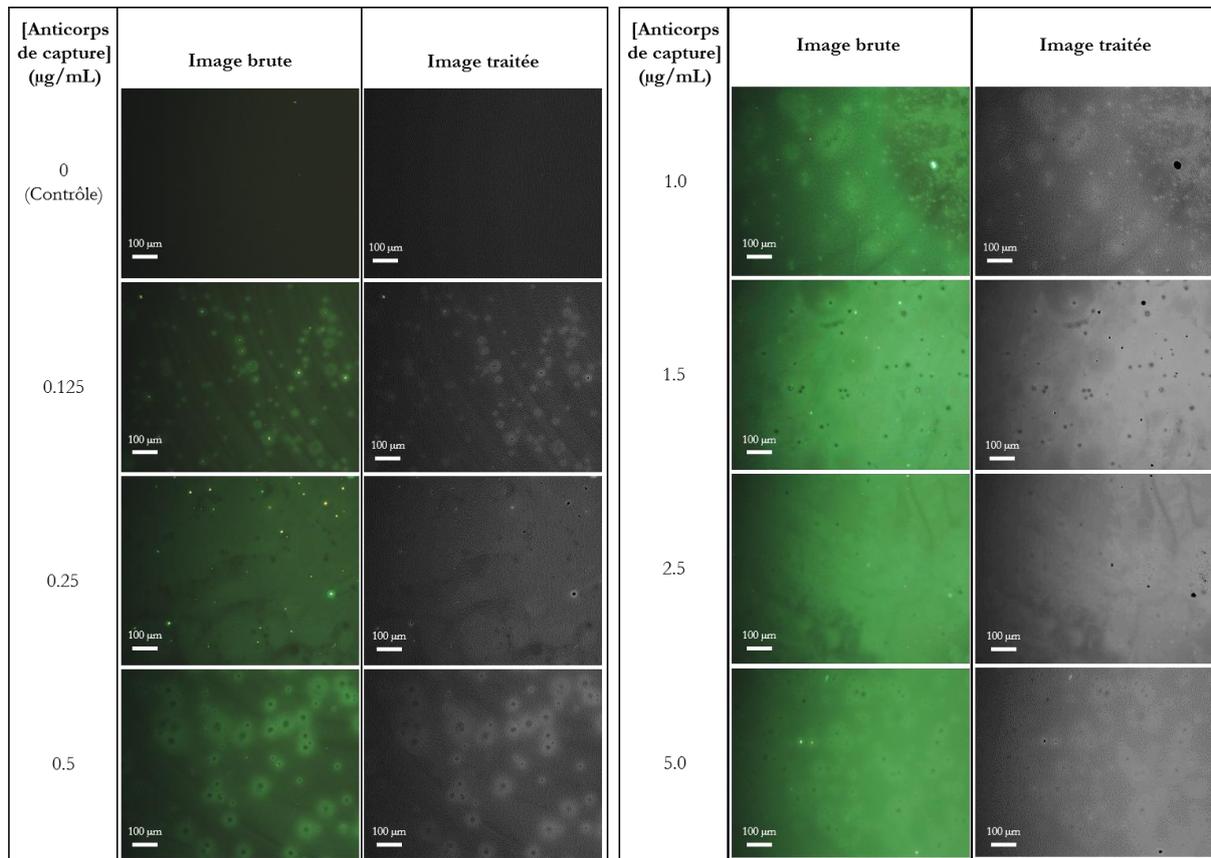


Figure 2 - 20. Série d'images de microscopie à fluorescence d'une surface de PDMS silanisé après greffage des anticorps de capture anti-TNF- α et détecté avec des anticorps anti-souris FITC (1 :100) (Exc 475 nm, X10, 1500 ms)

Nous pouvons observer deux portions de l'évolution de la courbe : une première portion de 0 $\mu\text{g/mL}$ à 1.5 $\mu\text{g/mL}$ avec une évolution linéaire de l'intensité avec la concentration en anticorps ($R^2 = 0.96$) ; une deuxième portion au-delà de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ où l'intensité n'évolue plus et fluctue autour d'un maximum. La première portion correspond à l'occupation progressive des sites de greffage sur les silanes de la surface de PDMS. La deuxième portion indique en revanche que tous les sites de greffages disponibles sont occupés et la saturation de ces sites provoque des fluctuations de l'intensité fluorescente autour d'un plateau vers 15 u.a. Par ailleurs, on peut noter l'absence de signal non spécifique sur l'échantillon contrôle à 0 $\mu\text{g/mL}$ (intensité de 0.31 ± 0.05 u.a. par rapport à la surface de référence de PDMS natif).

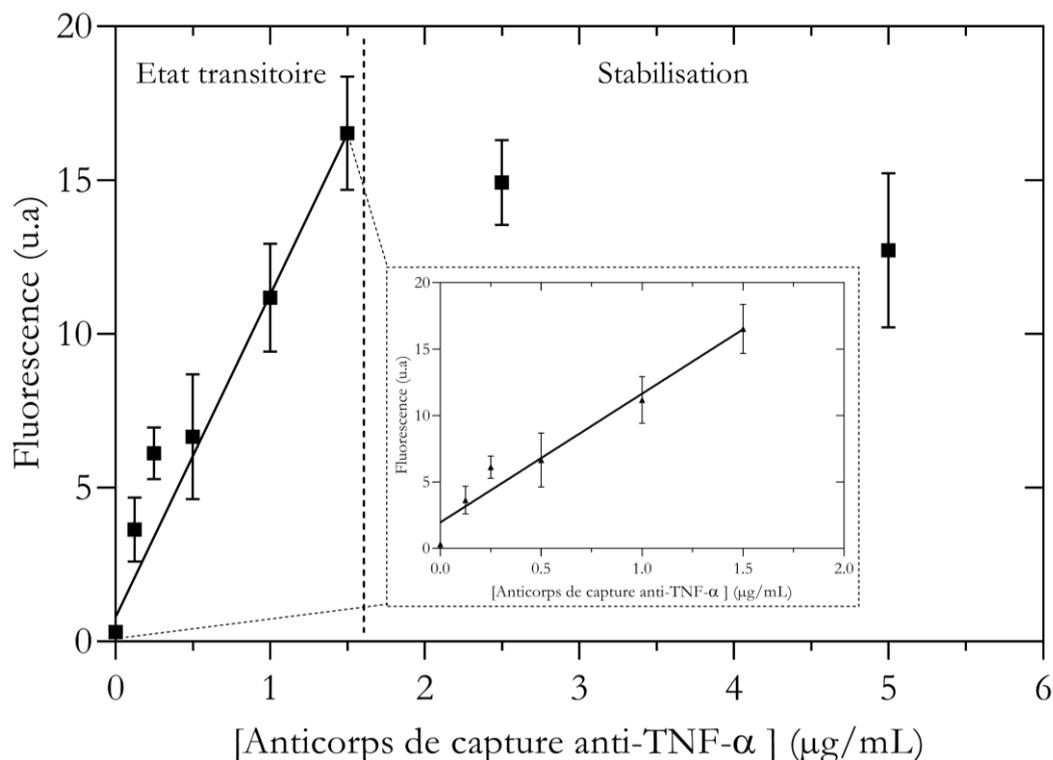


Figure 2 - 21. Evolution de la fluorescence de surface de PDMS silanisées et greffées avec des anticorps monoclonaux anti-TNF- α en fonction de la concentration en anticorps. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) a été soustraite des valeurs indiquées.

Finalement, la concentration de greffage retenue pour la couche d'anticorps de capture est de 1.0 $\mu\text{g/mL}$ afin de maximiser la réponse fluorescente, tout en évitant un phénomène de saturation des sites de greffage accessibles de la surface silanisée qui peut survenir à des concentrations plus importantes. Il reste désormais à s'assurer de la spécificité des différentes molécules de l'immunocomplexe entre elles ainsi que de contrôler la réponse du PDMS natif par rapport au PDMS silanisé pour ce type de greffage.

2.3.2. Contrôle des performances du PDMS silanisé par rapport au PDMS natif et étude de la spécificité du complexe immunologique

2.3.2.1. Évaluation des performances du PDMS silanisé par rapport au PDMS natif pour le greffage des immunocomplexes de TNF- α

Comme nous l'avons vu dans la présentation du PDMS, ce matériau est bien connu pour sa capacité à adsorber de façon non spécifique et aléatoire les protéines. Il est donc nécessaire d'évaluer l'impact de l'adsorption non spécifique sur les surfaces greffées à défaut de pouvoir l'empêcher.

Le premier contrôle consiste donc à évaluer le bénéfice de la silanisation du PDMS par rapport au PDMS natif. L'intérêt de la silanisation réside dans le contrôle du greffage des anticorps sur la surface en offrant des sites de greffage préférentiels par rapport au PDMS natif, améliorant l'homogénéité et la répétabilité du greffage d'une surface à l'autre. Ces bénéfices ont déjà pu être observés dans l'étude de greffage d'IgG modèle de la partie 2.2.2.6.

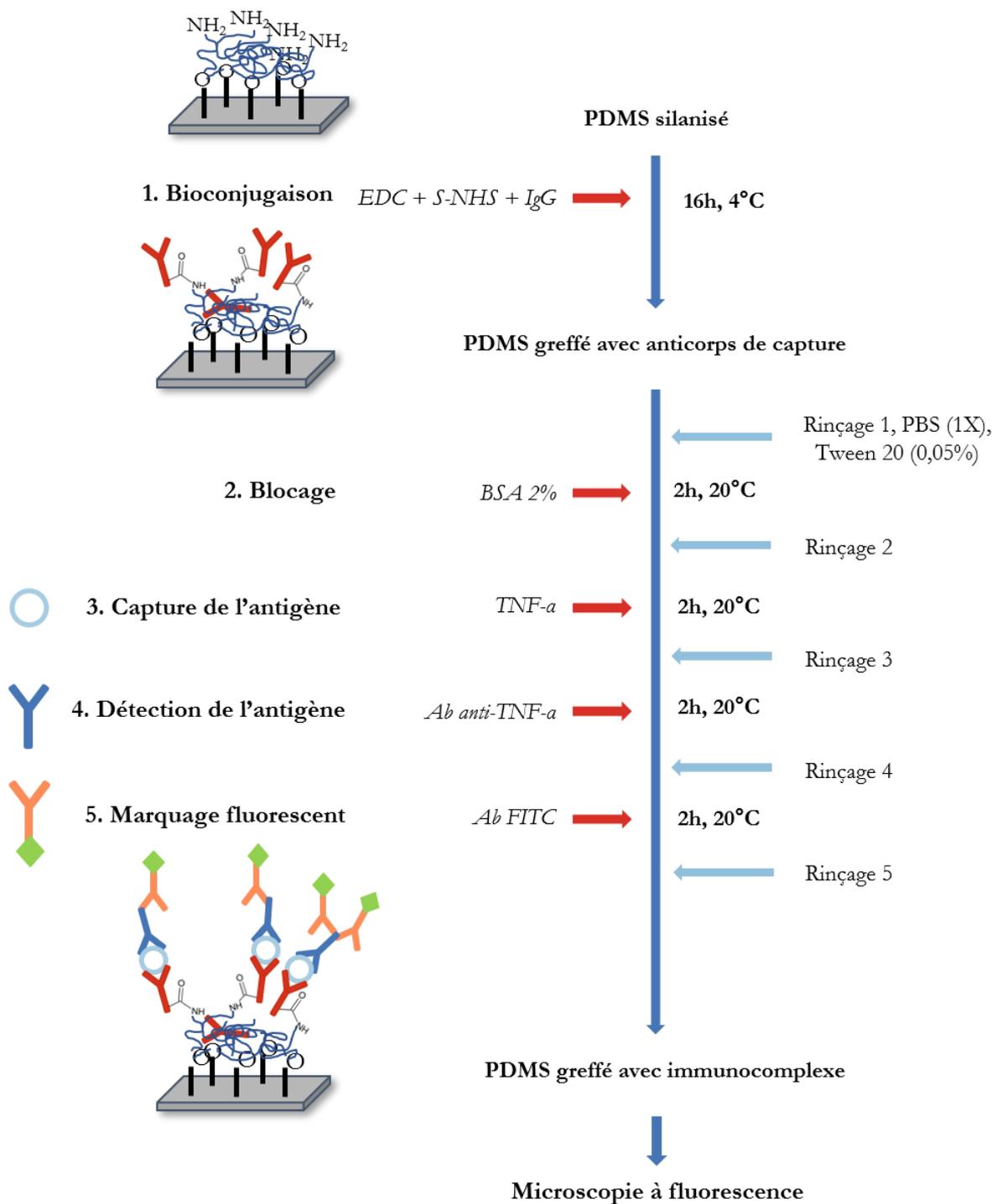


Figure 2 - 22. Schéma de la procédure d'immunodosage du TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisé

Nous avons donc procédé à un greffage des anticorps anti-TNF- α sur les deux types de surface avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anticorps, concentration sélectionnée dans la partie précédente. Pour cette comparaison, une faible concentration de TNF- α est choisie (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afin d'évaluer la sensibilité des deux surfaces, tout en évitant une saturation de la surface avec l'antigène. La procédure est schématisée sur la Figure 2 - 22 et détaillée en annexe.

Les mesures par microscopie à fluorescence montrent que le PDMS natif présente une réponse fluorescente de 17.88 ± 1.02 u.a. (RSD 5.7%) contre 19.39 ± 0.24 u.a. (RSD 1.2%) pour le PDMS silanisé. Les réponses fluorescentes sont donc proches en raison de la faible concentration en antigène, mais la dispersion de la réponse (RSD) entre les surfaces de PDMS natif est 4 fois plus importante que pour l'échantillon silanisé. Cette dispersion plus importante sur le PDMS natif implique un manque de répétabilité du greffage sur les surfaces de PDMS natif. Cela confirme les observations de l'étude sur les IgG modèles de souris de la partie 2.2.2.6. La silanisation semble donc bien apporter un meilleur contrôle des performances de greffage des anticorps anti-TNF- α sur le PDMS.

2.3.2.2. Évaluation de la spécificité des différents éléments de l'immunocomplexe de TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisées

Comme expliqué en introduction de la partie 2.3, l'immunocomplexe formé avec le TNF- α implique plusieurs entités biologiques avec des affinités et des spécificités différentes entre elles (anticorps de capture, anticorps primaire et secondaire, antigène). Afin de vérifier que le signal observé est bien lié à la détection du TNF- α , il est nécessaire de s'assurer de la spécificité des différentes étapes de formation de l'immunocomplexe. Pour cela, la réponse fluorescente de la surface doit être mesurée en retirant un des éléments du complexe et comparer à l'échantillon de référence sans anticorps.

Ainsi, la réponse fluorescente des surfaces a été évaluée en absence de première couche d'anticorps à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TNF- α . Enfin, un échantillon "blanc" sans TNF- α a aussi été étudié. La procédure est identique à celle décrite dans la Figure 2 - 22 et réalisée en triplicat. Les résultats sont résumés dans le Tableau 2 - 3.

Ainsi, nous pouvons remarquer que la réponse fluorescente du PDMS silanisé en absence d'anticorps de capture varie peu quelle que soit la concentration d'antigène, d'anticorps de détection et d'anticorps fluorescent. Le faible signal observé (~ 17 u.a) correspond à l'autofluorescence du PDMS observé à cette longueur d'onde (15.34 ± 0.05 u.a). Sans anticorps de capture, le reste de l'immunocomplexe ne peut être construit ; ce qui démontre bien la spécificité du complexe entre ses différents éléments et sa faible affinité pour une surface de PDMS non greffée. Nous pouvons donc conclure que la présence des silanes en surface assure la qualité du greffage des anticorps de capture, et qu'en l'absence de ces derniers, l'immunocomplexe reste peu sensible à la surface silanisée. De même, l'absence de TNF- α résulte en une réponse fluorescente similaire (18.86 ± 0.38 u.a). Cette réponse peut sembler proche de la réponse précédente sur le PDMS natif, mais nous avons travaillé à de très faibles concentrations de TNF- α . L'objectif était dans ce cas de comparer avec l'autofluorescence du matériau en l'absence d'antigène. Dans le cas du PDMS natif, nous nous sommes intéressés davantage à la dispersion de la réponse. Ainsi, chaque élément de la surface et du complexe est donc indispensable à la formation de l'immunocomplexe et à la détection du TNF- α .

Tableau 2 - 3. Récapitulatif des expériences contrôles sur les surfaces de PDMS silanisées en l'absence d'anticorps de capture et en l'absence d'antigène

Echantillon		Type de surface	[Anticorps de capture] ($\mu\text{g/mL}$)	[TNF- α] ($\mu\text{g/mL}$)	[Anticorps de détection de chèvre anti-TNF porcin ¹] ($\mu\text{g/mL}$)	Anticorps FITC anti-chèvre ($\mu\text{g/mL}$)	Intensité fluorescente moyenne \pm SD (u.a.) sans soustraction de l'auto-fluorescence du PDMS
Sans anticorps de capture 	<i>Echantillon contrôle</i>	<i>PDMS silanisé sans anticorps de capture</i>	0	1	1	10	17.31 \pm 0.22
	<i>Echantillon contrôle</i>	<i>PDMS silanisé sans anticorps de capture</i>	0	5	10	100	16.42 \pm 0.14
Sans antigène 	<i>Echantillon "blanc"</i>	<i>PDMS silanisé avec anticorps de capture</i>	1	0	1	10	18.86 \pm 0.38

Nous avons donc pu contrôler les différents éléments validant la spécificité de la détection sur les surfaces silanisées ainsi que le bénéfice de la silanisation pour les performances de greffage des anticorps de capture, notamment en matière d'homogénéité de la réponse. Il est désormais possible d'utiliser les surfaces silanisées pour l'immunodosage du TNF- α dans la partie suivante.

¹ Au moment des expériences, le fournisseur (Sigma-Aldrich) n'avait plus d'anticorps anti-TNF- α humain et nous a proposé des anticorps anti-porcins, soulignant que la réactivité était similaire du fait d'un génome à 80% identique [54]

2.4. Immunodosage du TNF- α sur les surfaces de PDMS silanisées

Dans les parties précédentes, nous avons validé la concentration optimale d'anticorps de capture anti-TNF- α . Nous avons également vérifié qu'en l'absence d'anticorps de capture ou de TNF- α , la réponse fluorescente de la surface silanisée restait similaire au bruit de fond de la surface.

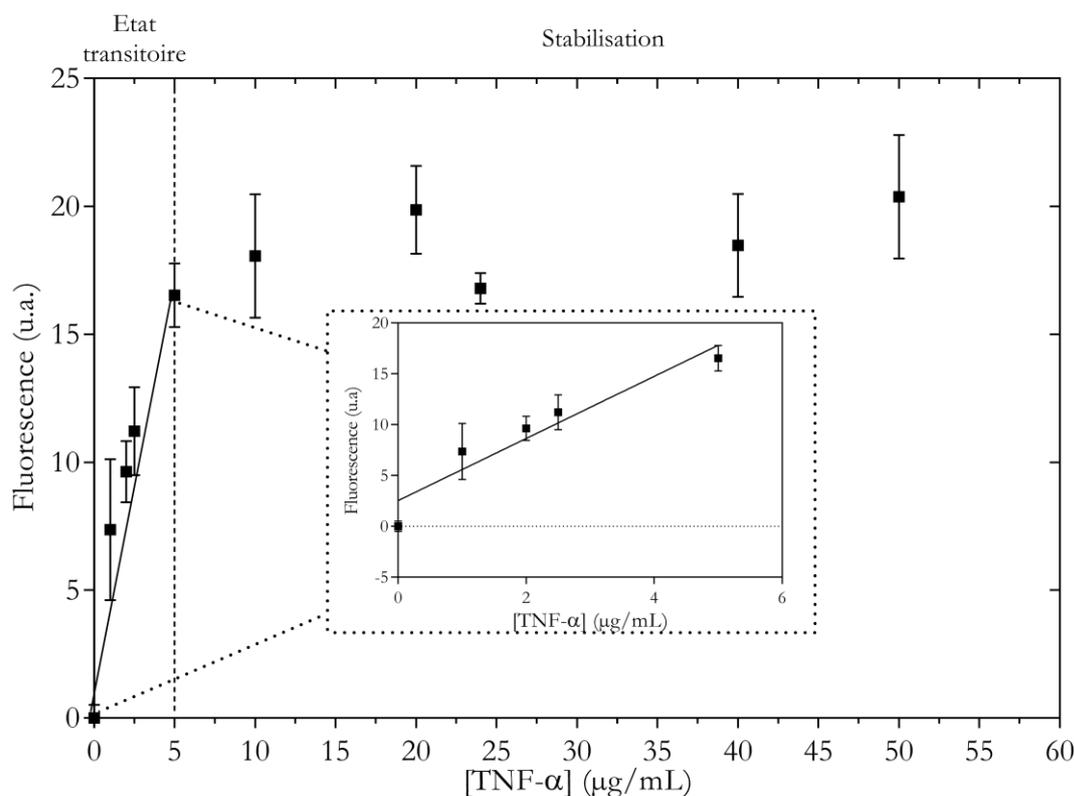


Figure 2 - 23. Courbe d'immunodosage du TNF- α humain sur des surfaces de PDMS silanisées. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) a été soustraite des valeurs indiquées.

Dans cette partie, nous allons utiliser les surfaces de PDMS silanisées avec 20% d'APTES pendant 30 minutes pour l'immunodosage du TNF- α humain en solution.

Pour cela, le même protocole de greffage décrit dans la Figure 2 - 22 a été utilisé et la concentration de TNF- α a été variée sur une gamme de 0 à 50 $\mu\text{g/mL}$. La Figure 2 - 23 présente la réponse en fluorescence des surfaces en fonction de la concentration de TNF- α .

Nous observons un comportement linéaire ($R^2 = 0.91$) de la réponse entre 0 et 5 $\mu\text{g/mL}$. La réponse de l'échantillon à 0 $\mu\text{g/mL}$ a été évaluée à 18.36 ± 0.38 u.a. ; soit une réponse similaire aux échantillons contrôles sans première couche d'anticorps. Cette valeur a donc été soustraite des intensités mesurées pour les autres concentrations.

Des fluctuations de la réponse fluorescente sont observées aux plus hautes concentrations, au-delà de 5 $\mu\text{g/mL}$. Cela peut s'expliquer par une saturation des sites de greffage accessibles sur la surface résultant en un plateau de la réponse fluorescence.

La limite de détection a été évaluée à 0.55 $\mu\text{g/mL}$ (31.6 nM). Cette valeur de limite de détection est à mettre en lumière de la sensibilité de la détection par fluorescence, qui reste une technique

sujette à des nombreuses limitations (quenching, bleaching). Seo *et al* [39] ont obtenu une limite de quantification 1000 fois plus basse pour la détection de l'IFN- γ sur des substrats de verre silanisés, sans les limitations du PDMS. Cesaro-Tadic *et al* [40] ont obtenu une limite de détection de 20 pg/mL dans un dispositif microfluidique sur du PDMS natif en adsorbant de manière non-spécifique 100 fois plus d'anticorps de capture anti-TNF- α et 50 fois plus d'anticorps de détection.

D'autres techniques plus sensibles ont permis d'atteindre des limites de détection de 20 pg/mL par détection électrochimique [41] et 20 pg/mL par détection avec une microbalance à quartz [42]. La perspective d'application aux fluides biologiques nécessitera d'atteindre des limites de détection de l'ordre du pg/mL, concentration à laquelle on retrouve le TNF- α [43].

Par ailleurs, l'immunodosage est ici effectuée en "pleine plaque", sur des surfaces de PDMS où l'adsorption non spécifique n'est pas contrôlée. La transition vers un milieu confiné en microfluidique ainsi que le développement d'un traitement de surface minimisant l'adsorption non spécifique dans la partie suivante a notamment permis d'améliorer les performances de détection des surfaces préparées.

Conclusion intermédiaire de la partie 2

Ainsi, dans cette partie, nous avons présenté un protocole de silanisation de surface optimisé pour le PDMS afin d'obtenir des surfaces stables, homogènes, réactives et biosensibles. Pour cela, différentes techniques de caractérisation ont été utilisées pour suivre l'évolution des surfaces durant le processus de fonctionnalisation. Ces surfaces ont ensuite été évaluées sur leur capacité à greffer des anticorps de manière spécifique et reproductible, avec de meilleures performances par rapport au PDMS natif. Enfin, une preuve de concept de l'utilisation de ces surfaces pour l'immunodosage du TNF- α a été réalisée, aboutissant à des résultats encourageants pour la suite de l'étude et l'intégration en microfluidique.

3. Biofonctionnalisation du PDMS en conditions microfluidiques

Dans la partie précédente, nous avons développé un protocole de silanisation pleine plaque de surfaces de PDMS. Des conditions favorables de silanisation ont été sélectionnées (20% APTES dans l'éthanol, 30 minutes de réaction) afin d'assurer une couche d'aminosilanes homogènes, stables et réactives pour le greffage d'anticorps.

Les expériences d'immunodosage menées sur ces surfaces ont montré leur potentiel pour l'immunodosage du TNF- α avec une limite de détection de 0.55 μ g/mL. Cependant, les interactions limitées entre la surface et les solutions en pleine plaque n'offrent pas des conditions favorables à un greffage localisé, limitant en partie la sensibilité de la détection. De plus, la grande quantité de réactifs nécessaires pour les réactions et les longs temps d'incubation restent des limites inhérentes à ce protocole. L'assemblage de ces surfaces avec des canaux microfluidiques de PDMS permettrait d'apporter un environnement confiné plus stable, avec des réactions optimisées en termes d'interactions entre les fluides et la surface, en consommation de réactifs et en temps. La réalisation d'un protocole de greffage d'anticorps et détection en conditions fluidiques permettrait ainsi d'améliorer les performances de l'immunodosage du TNF- α .

En effet, la microfluidique présente de nombreux avantages, notamment pour la biochimie,

comme décrit dans le chapitre 1. Dans cette partie, nous allons tout d'abord détailler la fabrication des dispositifs fluidiques et vérifier l'intégrité des surfaces silanisées après scellement des puces microfluidiques. Puis nous présenterons un protocole de passivation des canaux de PDMS afin de limiter l'adsorption non spécifique des protéines sur les parois non silanisées des canaux. Enfin, les dispositifs fabriqués seront utilisés pour développer un protocole de greffage d'anticorps sous flux en vue de l'immunodosage du TNF- α au sein de la puce.

3.1. Fabrication des dispositifs fluidiques pour l'immunodosage

3.1.1. Fabrication des canaux

La fabrication des canaux microfluidiques suit le principe de la *soft lithography* popularisée notamment par l'équipe de George Whitesides [44]. Cette technique repose sur la fabrication de moules (*master mold*) sur différents matériaux, mais couramment en résine époxy SU-8. La SU-8 est commercialisée par MicroChemicals sous plusieurs références, de viscosité variable, permettant de déposer des épaisseurs allant de quelques microns à plusieurs centaines. C'est une résine photosensible négative structurée par insolation aux UV au travers d'un masque représentant le négatif du motif à reproduire.

3.1.1.1. Fabrication des moules en SU-8

La première étape consiste donc à enduire des substrats de silicium de 2 pouces avec de la résine SU-8 afin d'obtenir une épaisseur de 50 μm qui sera la hauteur des canaux microfluidiques. Pour cela, le protocole suivant a été développé par le laboratoire :

- (i) La veille : préparation d'un petit flacon de SU-8 2050 avec la quantité nécessaire pour la production des moules (environ 3g par moule) afin d'éviter de manipuler une bouteille entière de résine et de s'assurer qu'aucune bulle ne sera présente dans le mélange au moment de l'enduction du wafer
- (ii) Nettoyage des substrats de silicium dans l'acétone et de l'isopropanol pendant 5 minutes respectivement
- (iii) Déshydratation des wafers à 125°C pendant 10 minutes
- (iv) Dépôt de la résine sur le wafer sur environ $\frac{2}{3}$ de la surface
- (v) Enrésinement :
 1. 500 rpm 10s 200 rpm/s (pré-étalement de la résine)
 2. 3700 rpm 30s 200 rpm/s
- (vi) Recuit 2 min 65°C puis 7 min à 95°C

La microstructuration de la résine nécessite la conception de masques négatifs avec les motifs à reproduire. Les masques sont dessinés sur ordinateur sur un logiciel de dessin vectoriel (InkScape ©) puis imprimés dans une imprimerie professionnelle (Imprimerie IDM, Paris) pour être reproduits sur des transparents plastifiés (voir Figure 2 - 24). Ils sont ensuite collés sur une plaque en verre (SodaLime) afin d'être utilisés sur un aligneur de lithographie UV. L'avantage d'utiliser des transparents réside dans son faible coût de production d'une feuille A4 contenant plusieurs masques (10€ par feuille) contre plusieurs centaines d'euros pour un masque en chrome standard de lithographie. Néanmoins, la résolution minimale des motifs est plus limitée (20 μm minimum).

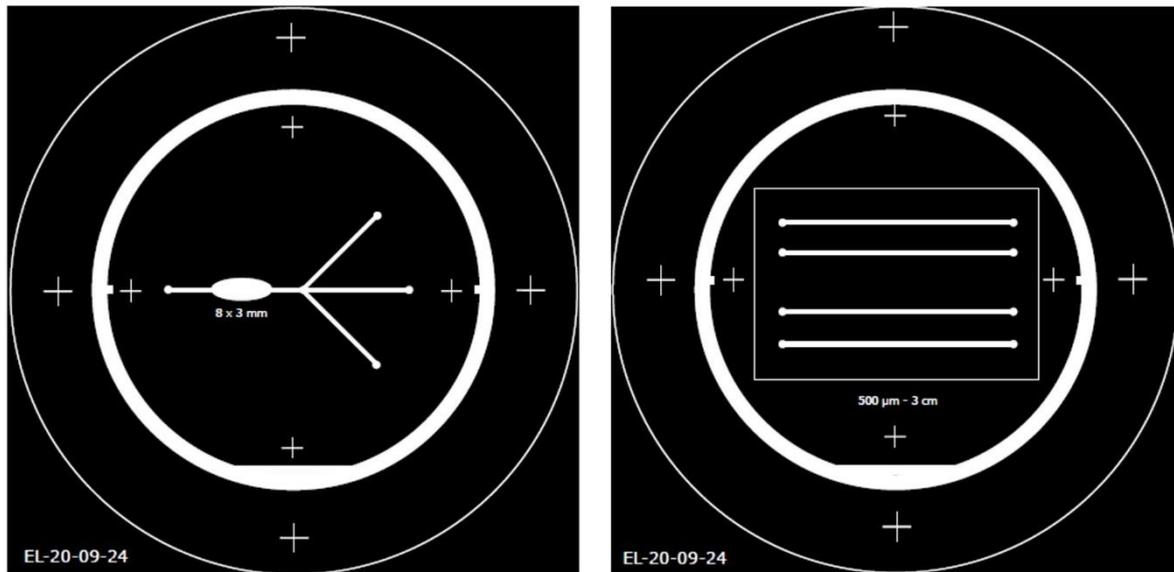


Figure 2 - 24. Exemple de masques microfluidiques pour substrat de silicium de 2 pouces imprimés sur plastique transparent

Une fois le masque installé sur l'aligneur, le substrat recouvert de SU-8 est insolé pendant 25s ($180 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) sur un aligneur Suss MJB4 en large bande (lampe UV de puissance $7.5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ à 365 nm).

Le substrat est ensuite recuit sur plaque à 65°C pendant 2 minutes puis 95°C pendant 7 minutes. Le motif est développé dans un bain de SU-8 Developer pendant 6 min puis rincé à l'isopropanol et séché à l'azote. Un moule ainsi préparé permet la réalisation de plusieurs puces de PDMS, bien que présentant une certaine fragilité nécessitant des précautions lors des manipulations pour maintenir son intégrité.

3.1.1.2. Moulage des canaux de PDMS

3.1.1.2.1. Méthodes traditionnelles

La méthode de moulage des canaux en PDMS jusqu'ici utilisée au laboratoire consistait à préparer un mélange de PDMS 10:1 (Sylgard 184, Dow Corning) prémélangé dans un *speedmixer* à 4000 rpm puis de le couler sur le moule en SU-8 contenu dans une boîte de Pétri en verre recouverte de papier aluminium. Le tout était ensuite mis à dégazer dans une cloche à vide puis recuit à 75°C pendant 2h. Néanmoins, cette méthode présente des inconvénients. Lors du dégazage, des bulles de PDMS peuvent se former entre le moule et le fond de la boîte, provoquant le soulèvement du moule et n'assurant pas son horizontalité durant le recuit. Dans notre cas, il était critique d'avoir une puce parfaitement plane pour la suite des expériences.

Une seconde méthode couramment utilisée consiste à coller le moule à une boîte de Pétri en plastique plus grande que le moule, puis de couler une large quantité de PDMS dans la boîte pour en couvrir toute la surface. Une fois recuit, seule la zone du motif est découpée sur le moule en SU-8 avec un scalpel. La partie moulée est ensuite extraite délicatement des restes de PDMS maintenant le moule en place. Les moulages suivants se font alors en remplissant uniquement la

cavité laissée sur le moule par la découpe précédente. Cette méthode à terme finit par endommager le moule lors de la découpe des motifs moulés et nécessite une boîte par moule.

3.1.1.2.2. Optimisation du moulage des puces de PDMS

Une tentative d'amélioration de cette étape a alors été entreprise afin de garantir à la fois la réutilisation multiple des moules et l'utilisation d'une quantité minimale de PDMS, d'éviter de jeter des boîtes en plastique, et surtout d'assurer la planéité du moule de PDMS produit, critère indispensable pour les expériences microfluidiques envisagées par la suite.

Pour cela, un prototype de moule réutilisable a été fabriqué en impression 3D. Celui-ci permet le maintien du moule à l'horizontale avec un cerclage à vis et s'adapte à la taille du wafer 2 pouces pour limiter la consommation de PDMS. Pour un moule SU-8 de 2 pouces, 12 g de PDMS non réticulé sont coulés pour obtenir une puce de 1 cm d'épaisseur. L'ensemble est mis à dégazer pendant 30 minutes dans une cloche à vide puis recuit pendant 2h à 75°C dans une étuve.

Le prototype permet bien une faible consommation de PDMS et l'obtention de puces épaisses parfaitement planes. En revanche, des précautions sont à prendre pour le démoulage car l'adhérence du PDMS sur le silicium et le papier d'aluminium rend toujours la probabilité de casse importante.



Figure 2 - 25. Prototype de moulage de puces de PDMS sur moule SU-8 de deux pouces : A. Pièces imprimées en 3D pour le maintien du moule ; B. Moules avec PDMS coulés avant recuit ; C. Puce de PDMS obtenues après démoulage, découpe et perçage des entrées/sorties sur les flancs de la puce.

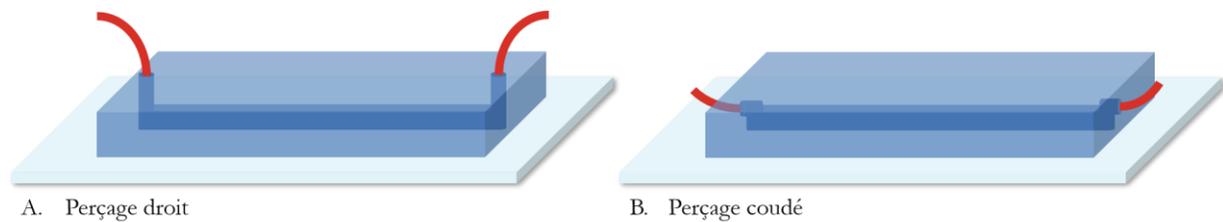


Figure 2 - 26. Schéma des deux types de perçage pour connecteurs fluidiques : A. Perçage droit avec connecteurs traversants ; B. Perçage en angle droit avec connecteurs sur les flancs de la puce

Après recuit, la puce est délicatement démoulée, découpée au scalpel et les entrées/sorties fluidiques sont percées sur les flancs de la puce avec un poinçon de biopsie de 1.25 mm. Les entrées/sorties sont placées sur les flancs de la puce afin de permettre une compression mécanique des 2 faces inférieures et supérieures pour l'étanchéité de la puce dans certaines étapes ultérieures. Cela permet aussi le maintien de la puce sur un support adapté à un module Peltier pour la régulation en température des expériences. Le poinçon est enfoncé au niveau des entrées/sorties des motifs (voir masque sur la Figure 2 - 24) sur la moitié de l'épaisseur de la puce afin d'éviter de traverser toute la puce et de provoquer une fuite sur la face opposée. Puis le poinçon est inséré sur le flanc de la puce à la perpendiculaire du trou précédent afin de rejoindre les deux orifices et former un angle droit pour l'insertion du tubulaire. Les entrées/sorties peuvent également être percées sur le dessus de la puce si le maintien mécanique n'est pas nécessaire, comme cela est généralement fait dans les puces classiques (voir Figure 2 - 26).

3.1.1.3. Scellement des puces microfluidiques

Pour refermer les puces, deux surfaces sont envisageables : du PDMS ou du verre. Dans notre cas, les puces devant être observées au microscope, une puce totalement transparente est préférable. Par ailleurs, il faut que l'ensemble de l'intérieur de la puce soit fait de PDMS. La surface plane refermant la puce est appelée "capot" et dans notre cas, est composée de PDMS enduit sur du verre afin d'assurer à la fois rigidité pour la manipulation et transparence pour l'observation. De plus, le PDMS s'enduit facilement sur le verre (voir partie 1.2).

Dans le cadre de notre étude, la taille des puces a été définie afin d'être adaptée au microscope et au support Peltier pour les expériences de greffage d'anticorps sous flux. De ce fait, un capot de la taille d'une demi-lame de verre de microscope a été fixé, soit : 25 mm x 37.5 mm. Les lames de microscope sont découpées en deux à l'aide d'une scie à fil puis nettoyées à l'acétone et l'isopropanol pour être enduites de 50 μ m de PDMS selon les mêmes paramètres que les substrats de silicium décrit dans la partie 1.2.

Pour sceller les puces, un collage irréversible est effectué entre le PDMS moulé et le capot de PDMS (cela fonctionne aussi très bien sur le verre). Il s'agit d'un collage reposant sur la formation de liaisons Si-O-Si entre les deux supports. Tout d'abord, les parties à coller sont exposées à un plasma d'oxygène afin de former des groupements Si-OH en surface. Dans notre cas, le plasma est effectué dans un délaqueur Diener PICO à une puissance de 160W, une pression de 0.4 mbar en O₂ pendant une minute. La puce et le capot exposés au plasma sont mis en contact sans attendre. Il faut veiller au bon positionnement de la puce sur la surface car une fois les deux matériaux collés, il est difficile de modifier leur position sans abîmer la puce. Le tout est ensuite mis dans une étuve à 75°C pendant 1h afin de favoriser la réaction de condensation entre les groupements silanols (une molécule d'eau est créée lors de la formation de la liaison Si-O-Si) (voir Figure 2 - 27).

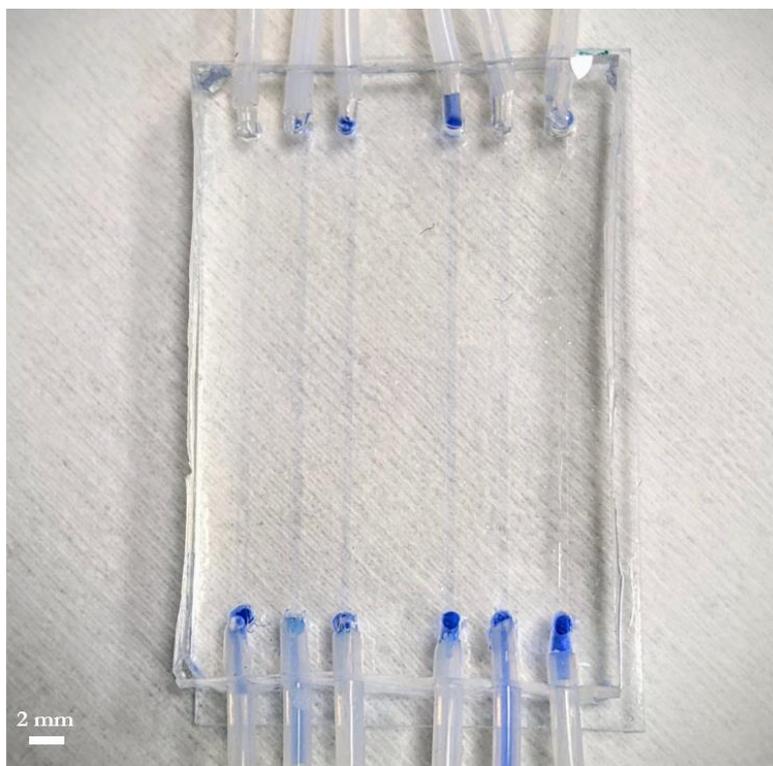


Figure 2 - 27. Puce microfluidique à 6 canaux avec connections fluidiques, réalisée dans du PDMS et collée sur une demi-lame de verre de microscope recouverte de 50 μm de PDMS

3.1.2. Stabilité de la silanisation après scellement des puces

Les conditions de collage précédemment décrites peuvent altérer la chimie de surface de la surface silanisée au sein de la puce. Aussi, il nous a paru essentiel de vérifier que la silanisation n'est pas endommagée par l'étape de collage de la puce, en particulier par le plasma et le recuit en étuve.

Pour cela, des canaux de PDMS sont moulés avec la technique précédemment décrite et des entrées/sorties percées. Le capot, composé d'une demi-lame de verre recouverte d'une fine couche de PDMS (50 μm), est silanisé selon le protocole décrit dans la partie 2 de ce chapitre (20% APTES, 30 minutes). Les deux éléments sont alors collés par un plasma O_2 et recuits en étuve afin de sceller la puce. Un test simple consistant à injecter une solution de fluorescamine à la micropipette, puis rincer le canal à l'eau déionisée, a permis de confirmer la réactivité des amines primaires de la surface silanisée à l'intérieur du canal, avec une intensité fluorescente de 24.41 ± 1.69 u.a. contre 18.02 ± 0.42 pour un canal non silanisé. La réactivité des amines semble donc être conservée même après plasma et recuit. Cependant, seuls les tests de greffage avec anticorps peuvent réellement confirmer la stabilité de la surface après collage de la puce.

Par ailleurs, nous avons mentionné et constaté à plusieurs reprises la capacité du PDMS natif à adsorber les protéines à sa surface. Or, au sein de la puce, seule une face des canaux est silanisée, celle du capot. Le reste du canal est constitué de PDMS natif appartenant à la partie moulée. Aussi, avant d'injecter des anticorps dans le canal, il est d'abord nécessaire de limiter l'adsorption des protéines sur les parois non silanisées. Pour cela, un protocole de passivation du PDMS est développé dans la partie suivante.

3.2. Protection du PDMS contre l'adsorption non spécifique des protéines

Comme expliqué dans la partie 1, le PDMS est un matériau naturellement hydrophobe, sur lequel les protéines s'adsorbent très facilement, de manière non spécifique et incontrôlée. De même, les expériences de greffage réalisées en pleine plaque sur les surfaces de PDMS natif ont montré que des anticorps s'adsorbent aussi facilement et durablement sur le matériau. La réponse fluorescente obtenue sur le PDMS natif dans la partie 2.3.2.1 est presque aussi intense que le PDMS silanisé, bien que moins homogène et reproductible.

Il s'agit d'un inconvénient majeur pour la sensibilité et la spécificité des immunodosages destinés à être réalisés sur les surfaces de PDMS préparées. Aussi, il nous a fallu mettre au point une méthode de passivation (protection contre l'adsorption non-spécifique) du PDMS permettant de protéger l'ensemble des surfaces non silanisées de la puce. En effet, les parties silanisées étant plus hydrophiles (voir étude partie 2.2), les phénomènes d'adsorption non spécifique sont minimisés par la silanisation au profit des greffages covalents des molécules par conjugaison avec EDC/S-NHS.

Un protocole utilisant du polyéthylène glycol (PEG ou PEO, l'appellation varie en fonction de la longueur de la chaîne de polymère formée) a été développé au laboratoire durant les thèses de Ha Hong Cao [45] et Olivier Lefebvre [46] pour la passivation du PDMS. Il a l'avantage d'être peu coûteux et rapide à mettre en œuvre.

3.2.1. Description générale du protocole de passivation avec le PEO

Le PEO est un polymère de structure $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$, biocompatible, stable chimiquement aux acides, aux bases, à la chaleur, à l'air, soluble dans l'eau et dans différents solvants organiques, ce qui en fait un revêtement de choix pour le PDMS qui présente une compatibilité comparable. Le PEO et des dérivés ont été notamment utilisés pour la modification de capillaire de silice en chimie analytique afin de modifier le flux électro-osmotique du capillaire pour l'analyse de protéines [47].

La fixation du PEO sur la silice repose principalement sur deux mécanismes : l'un de greffage covalent, l'autre d'adsorption physique.

Pour le greffage covalent, ce sont les extrémités de la chaîne de PEO qui amorcent la réaction par une condensation du groupement alcool du PEO et du groupement silanol de la surface pour former un ester Si-O-C. L'attaque nucléophile sur le groupement silanol nécessite néanmoins une catalyse acide afin de protoner le groupement silanol en Si-OH_2^+ et ainsi permettre la réaction d'estérification. Alcantar *et al* [48] soulignent que la réaction peut être favorisée par un apport constant en PEO. Ce type de greffage offre une stabilité prolongée de la couche de PEO formée en surface du fait de la liaison covalente établie avec la surface.

Concernant l'adsorption physique, elle met en jeu des interactions hydrophiles-hydrophobes entre les chaînes de PEO et la surface. Pour une surface hydrophobe comme le PDMS natif, le PEO sera principalement lié par des interactions hydrophobes. Pour du PDMS oxydé, hydrophile,

des liaisons hydrogènes peuvent se former entre les groupements silanols et les atomes d'oxygène du PEO. Ce type d'interactions, moins fortes et plus instables, nécessite un renouvellement fréquent du revêtement d'après Preisler *et al* [47]. Pour ce protocole aussi, une catalyse acide favorise le revêtement de la silice par le PEO.

3.2.2. Mise en œuvre du protocole de passivation

La transposition de tels mécanismes au PDMS repose sur la capacité à former des groupements silanols sur le PDMS à l'aide d'un plasma oxygène, le rapprochant de la structure de la silice. Le principe repose sur les interactions entre les groupements silanols Si-OH en surface du capillaire ou du canal et les chaînes de PEO. Nous supposons que les deux types de mécanismes peuvent intervenir sur le PDMS, avec du greffage covalent par endroit pour amorcer la réaction de revêtement, puis la formation d'une ou plusieurs couches par interactions non covalentes.

3.2.2.1. Protocole pleine plaque

Le protocole suivi pour la passivation du PDMS par le PEO en pleine plaque a été adapté de Preisler *et al* [47] par Ha Hong Cao [45]. Il est détaillé en annexe.

Il consiste à immerger la surface de PDMS dans une solution de HCl (1M) après l'avoir activé avec un plasma O₂. La surface est ensuite rincée puis mise en contact avec une solution de PEO (0.2%) acidifiée avec du HCl (0.1M). L'échantillon est enfin rincé et séché (voir Figure 2 - 28).

Ce protocole a été appliqué à des surfaces de PDMS natif en pleine plaque afin d'évaluer la passivation contre l'adsorption non spécifique. Pour cela, le même protocole de greffage d'anticorps modèles de souris de la partie 2.2.2.6 a été utilisé sur des échantillons de PDMS natif non passivés et des échantillons passivés avec le protocole décrit ci-dessus. Les observations en microscopie à fluorescence sont visibles sur la Figure 2 - 29.

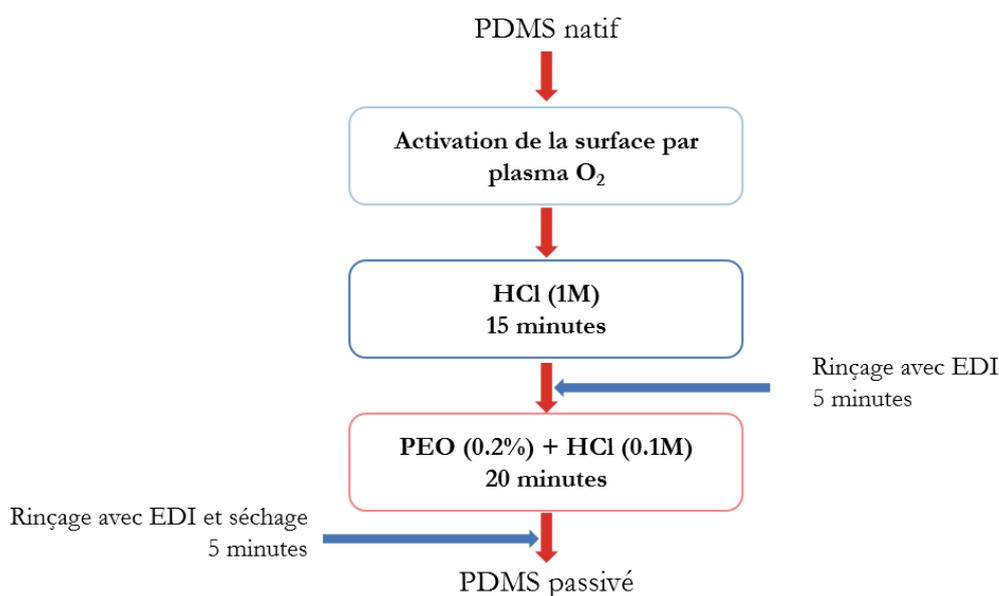


Figure 2 - 28. Protocole de passivation du PDMS natif par le PEO développé en pleine plaque par Ha Hong Cao [45]

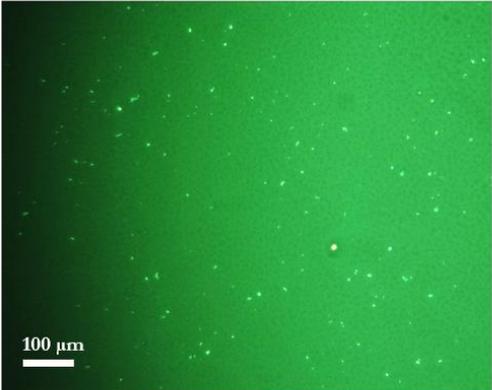
Echantillons	Fluorescence (u.a.)	Image de la surface (475 nm, 1500 ms)
PDMS natif sans PEO	46.41 ± 7.59	
PDMS natif passivé avec PEO	15.50 ± 0.17	

Figure 2 - 29. Résultats des expériences de passivation du PDMS natif avec le PEO selon le protocole de Ha Hong Cao [45]. Les anticorps greffés sont des IgG modèles de souris à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les anticorps fluorescents sont des anticorps anti-souris FITC à 1:200. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) n'a pas été soustraite des valeurs indiquées.

Nous pouvons constater que la passivation au PEO semble être efficace sur le PDMS natif avec une réponse fluorescente de 15.50 ± 0.17 u.a. pour une surface passivée, soit une réponse proche de l'autofluorescence du PDMS (15.34 ± 0.05 u.a.). La surface non passivée présente quant à elle une réponse de 46.41 ± 7.59 u.a. due à l'adsorption non spécifique des IgG de souris sur la surface.

Ce protocole est donc efficace sur des surfaces pleine plaque, il reste cependant à l'appliquer dans les canaux, ce qui nécessite une adaptation du protocole.

3.2.2.2. Protocole en conditions fluidiques

Un protocole de passivation sous flux des canaux avait été adapté par Olivier Lefebvre [46], utilisant les mêmes solutions mais en les injectant dans la puce en PDMS fraîchement scellée par plasma O_2 . Le plasma O_2 du collage servait également à l'activation de la surface pour le traitement PEO. Les solutions étaient ensuite injectées à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant le même temps que le protocole en pleine plaque.

Au cours de cette thèse, ce protocole a été utilisé pour traiter les parois des canaux de la puce avant assemblage avec des surfaces de PDMS silanisé et des surfaces de PDMS natif traitées avec le protocole PEO en pleine plaque. Pour vérifier l'efficacité de ce protocole, un greffage d'anticorps en conditions fluidiques a été appliqué avec des IgG de souris, comme décrit dans la Figure 2 - 30. Le protocole détaillé est donné en annexe.

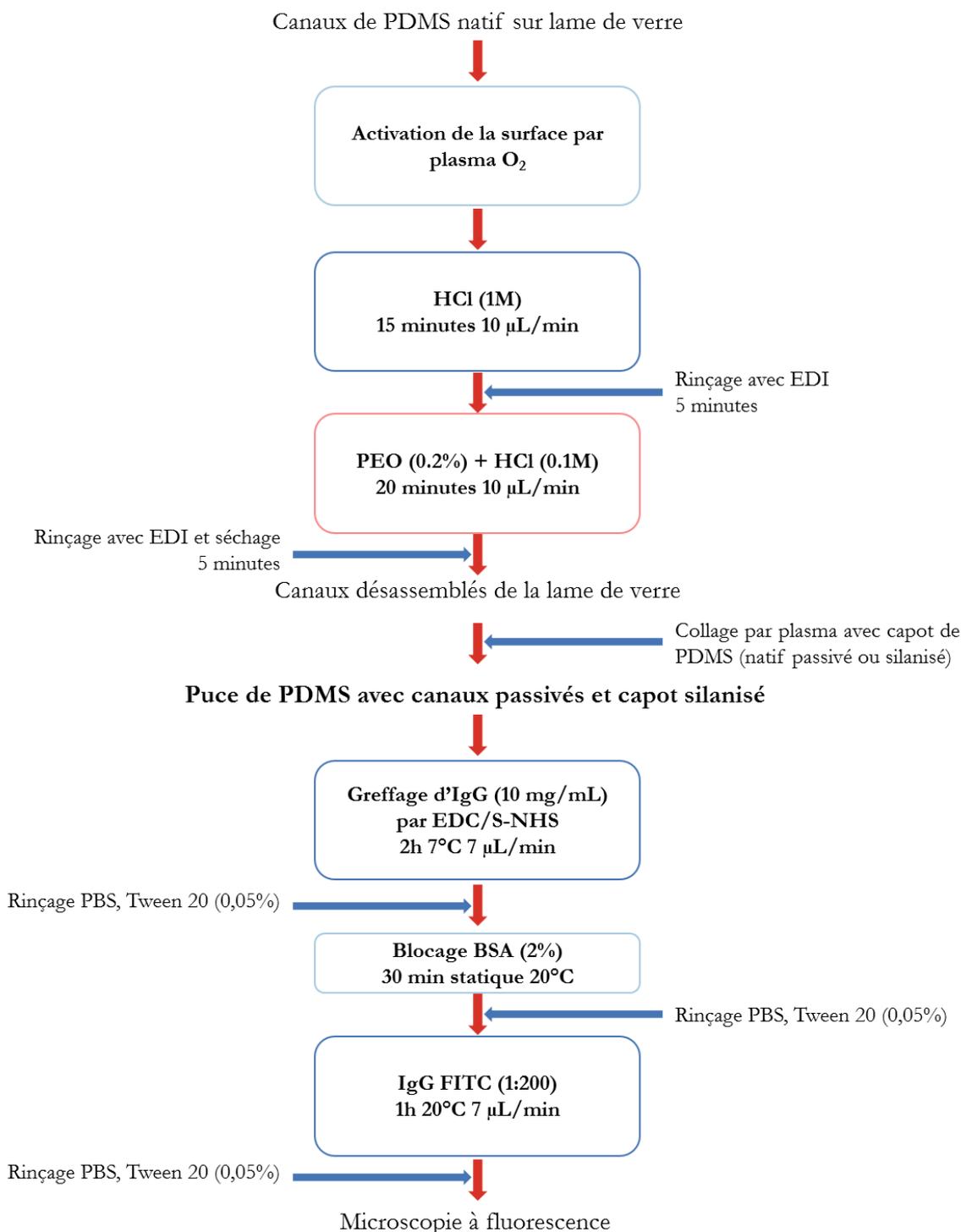


Figure 2 - 30. Protocole de passivation sous flux des canaux de PDMS et greffage des anticorps modèle de souris avec détection fluorescente

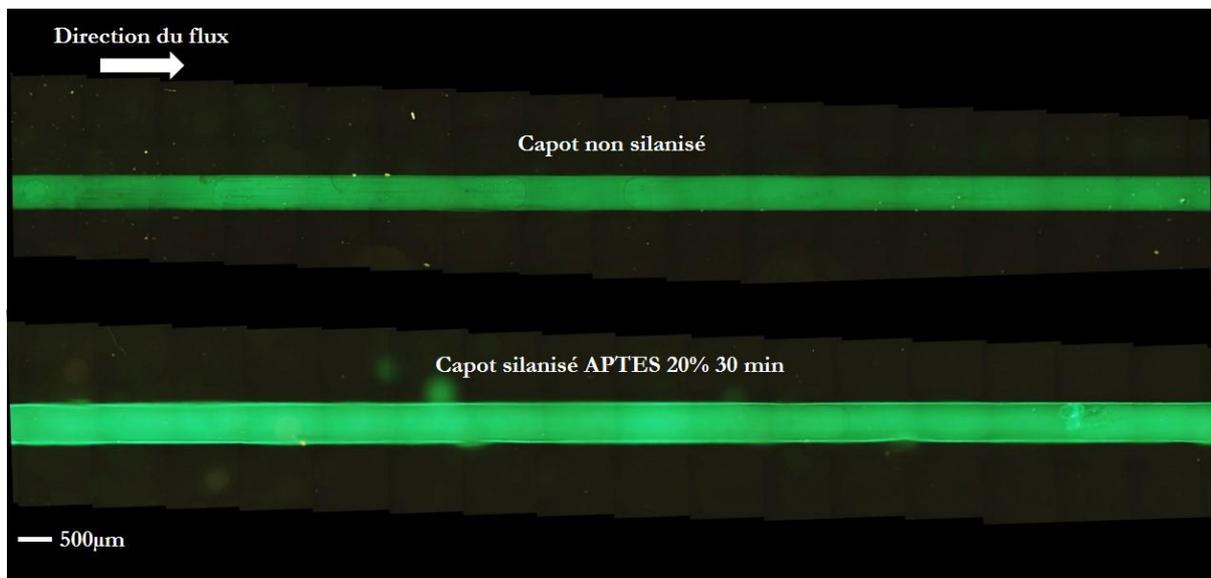


Figure 2 - 31. Image de microscopie à fluorescence des canaux de PDMS passivés en conditions fluidiques par le PEO avec capot silanisé et non silanisé (475nm, 1500 ms, x10).

Sur la Figure 2 - 31, nous observons deux canaux : un premier correspondant à l'assemblage d'un capot de PDMS natif traité avec le protocole PEO en pleine plaque décrit en Figure 2 - 28 et un canal traité avec le protocole PEO sous flux ; un second canal correspondant à l'assemblage d'un capot de PDMS silanisé avec 20% d'APTES dans l'éthanol pendant 30 minutes et un canal traité avec le protocole PEO sous flux.

Le canal avec le capot silanisé présente une réponse fluorescente de 63.66 ± 3.33 u.a contre 52.88 ± 0.84 u.a pour le canal avec capot passivé et non silanisé. Cela démontre l'inefficacité du protocole de passivation sous flux avec le greffage des anticorps car la réponse du canal passivé est plus élevée que la réponse d'un canal de PDMS sans anticorps (24.02 ± 0.34 u.a). Le protocole initialement développé par Olivier Lefebvre [46] ne concernait que des puces de PDMS natif sans surface silanisée ; ce qui ne nécessitait pas un désassemblage des canaux passivés pour être collés sur un autre type de capot. Ces protocoles ont donc dû être optimisés pour l'assemblage avec les surfaces silanisées afin de réduire l'adsorption non spécifique des anticorps au sein du canal de PDMS. Pour cela, les temps de traitement ont été rallongés afin de garantir un recouvrement complet des surfaces à traiter.

3.2.2.3. Optimisation du protocole de passivation par PEO

Le protocole a alors été repris et adapté pour les éléments du dispositif. Deux types de surfaces ont été traitées :

- des surfaces planes de PDMS correspondant au capot des puces, avec une couche de 50 μ m de PDMS enduite sur une demi-lame de verre de microscope ;
- des canaux de PDMS réalisés à partir des moules en SU-8.

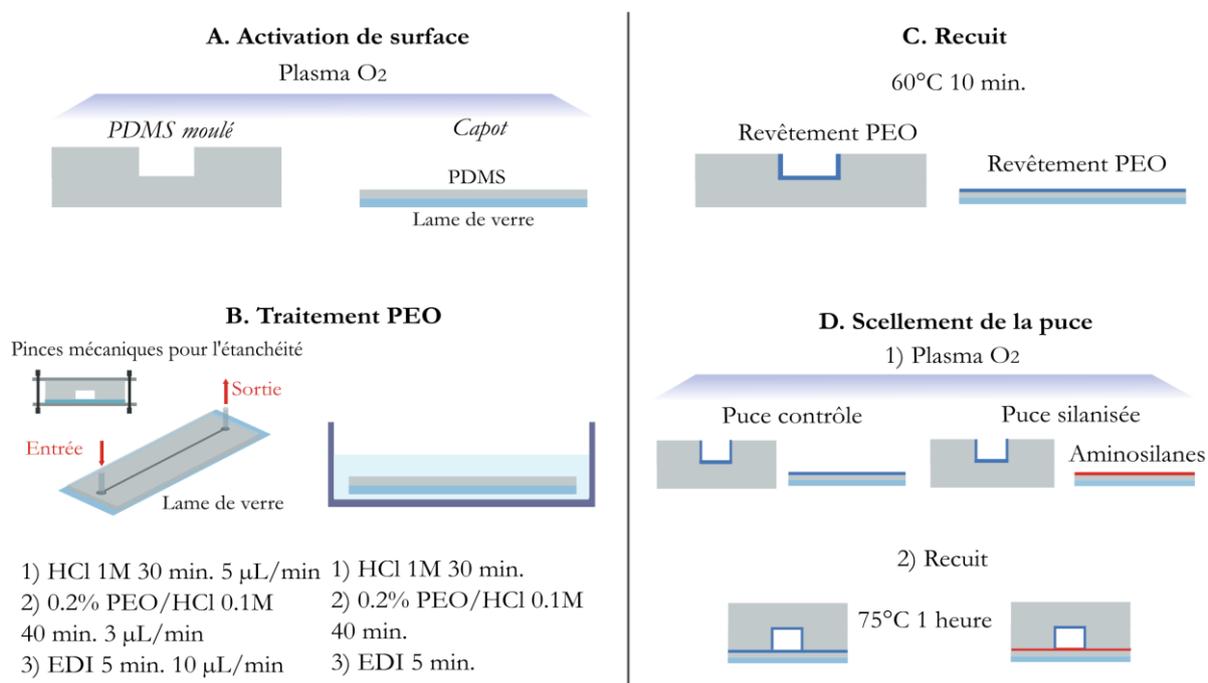


Figure 2 - 32. Schéma du protocole de passivation optimisé des puces de PDMS silanisées et des puces contrôles non silanisées

Dans notre cas, les traitements du capot et de la partie moulée doivent être dissociés, contrairement au protocole de Olivier Lefebvre [46]. Le capot doit être silanisé pour les puces destinées au greffage des anticorps et les parties moulées totalement protégées de l'adsorption non spécifique. De même, des puces « contrôles » non silanisées ont été préparées afin de comparer les performances des puces silanisées à celles de puces passivées. La Figure 2 - 32 regroupe l'ensemble du protocole mis au point pour les deux types de puces.

Nous allons décrire ci-après le protocole de passivation pour les capots de PDMS en pleine plaque et le protocole pour les canaux en conditions microfluidiques.

3.2.3. Passivation du capot de PDMS natif pour les puces « contrôles »

La passivation du capot de PDMS natif intégré aux puces « contrôles » repose sur un protocole similaire à celui présenté par Ha Hong Cao, mais les temps de réaction ont été allongés et le rinçage entre l'étape de traitement par HCl et la solution de PEO acidifiée a été retiré. Cela permettait de conserver au mieux les groupements silanols protonés pour une meilleure efficacité de la réaction de fixation du PEO sur le PDMS. Le protocole détaillé est décrit en annexe.

Le revêtement du PDMS avec des chaînes de PEO modifie la surface du PDMS, affectant la morphologie et la mouillabilité de la surface. Il est donc intéressant de caractériser ces modifications par angle de contact et mesures AFM.

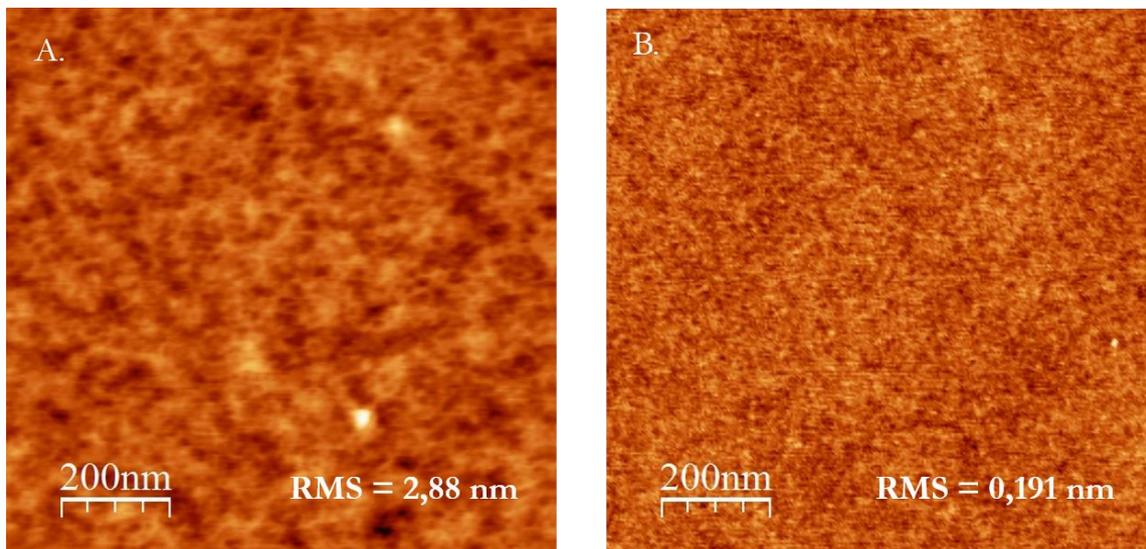


Figure 2 - 33. Mesures AFM sur un échantillon de PDMS natif (A) et traité avec le protocole PEO (B) (Peak Force, Scan rate 0.5 Hz)

Les mesures d'angle de contact sur le PDMS natif passivé avec le protocole PEO optimisé fournissent des valeurs moyennes d'angles de $51.10^\circ \pm 1.24$, soit une surface homogène à caractère hydrophile. Des valeurs similaires sont obtenues par Han *et al* [49] sur des microcanaux en PEO. L'angle de contact reste néanmoins plus élevé qu'une surface de PDMS ayant subi un plasma O_2 ($<5^\circ$). Cela pourrait s'expliquer par la présence des chaînes carbonnées hydrophobes sur la molécule de PEO ainsi que des groupements alcools hydrophiles.

Les mesures de rugosité sur différents échantillons de PDMS natif et PDMS passivé avec le PEO montrent une modification de la topologie du PDMS lors de l'étape de passivation. Les mesures sont effectuées en mode Peak Force sur un AFM Brüker Icon sur une zone de $1 \times 1 \mu m$. Les images AFM sont présentées sur la Figure 2 - 33.

La rugosité RMS diminue de 2.88 nm pour le PDMS natif à 0.191 nm pour le PDMS passivé. Cela s'explique notamment par le remplissage des pores et du relief du PDMS natif par les chaînes de PEO lors de la polymérisation en surface, résultant en une surface moins rugueuse, comme cela a été observé sur la silice par Alcantar *et al* [48].

Les analyses par angle de contact et AFM soutiennent donc que le protocole PEO ne dégrade pas la surface de PDMS. En effet, la surface obtenue après traitement est homogène, présente une mouillabilité en accord avec l'apport de chaînes moléculaires à tête hydrophile et une rugosité plus faible sans signe d'agrégation sur la surface.

3.2.4. Passivation des canaux

Pour le traitement des canaux en conditions fluidiques, la partie moulée de PDMS est découpée à la taille de la puce finale et percée avec les entrées/sorties sur les flancs de la puce, comme expliqué dans la partie 3.1.1. Elle est ensuite exposée à un plasma oxygène pour la formation des groupements Si-OH en surface. Les canaux sont apposés contre une lame de microscope non soumis à un plasma (afin d'éviter un collage irréversible sur le verre) et maintenue *via* des pinces

mécaniques. Le scellement est donc purement mécanique pour permettre de traiter les canaux puis de les dissocier de la lame de verre pour les réassembler avec le capot de PDMS silanisé ou passivé.

La solution de HCl (1M) est injectée pendant 30 minutes à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, puis la solution de PEO 0.2% acidifiée à 1:10 en HCl (1M) est injectée pendant 40 minutes à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Pendant toute la réaction, la puce est placée sur un support régulé en température à 20°C. La puce est ensuite rincée à l'EDI, décollée de la lame de verre et séchée à l'azote puis au four à 60°C pendant 10 minutes.

3.2.5. Évaluation de la passivation du PDMS en conditions fluidiques

Nous avons constaté que les protocoles de passivation initialement proposés ne suffisaient pas à protéger les puces de PDMS contre l'adsorption non spécifique. Un protocole optimisé a alors été proposé pour les capots de PDMS des puces « contrôles » et pour les parois des canaux des puces de PDMS silanisé. Afin de vérifier que les puces ainsi assemblées et traitées sont bien protégées contre l'adsorption non spécifique, une puce « contrôle », composée d'un capot de PDMS natif et deux canaux moulés, est passivée et injectée avec une solution d'anticorps.

Pour cette expérience, le protocole de greffage d'anticorps a été adapté par rapport à la partie 3.2.2.2 sur plusieurs points :

- Le protocole EDC/S-NHS a été modifié, avec une activation de la surface sans anticorps puis ajout des anticorps avec régulation en température
- L'étape de blocage à la BSA est effectuée sous flux et non plus en statique en l'absence de débit, afin d'optimiser les interactions entre la surface et la solution tout en restant à faible débit (3 $\mu\text{L}/\text{min}$)
- Deux concentrations d'anticorps FITC sont injectées dans deux canaux différents afin de mesurer si la réponse fluorescente varie avec la concentration en anticorps de détection

Le protocole est détaillé en annexe. Par ailleurs, la réponse fluorescente de la puce passivée est comparée à la réponse d'une puce non traitée, composée uniquement de PDMS natif. Les résultats de l'observation en fluorescence sont présentés sur la Figure 2 - 34.

L'intensité de fluorescence sur les deux canaux passivés est de 26.64 ± 0.36 u.a. (A) et 26.60 ± 0.46 u.a. (B) respectivement pour les deux concentrations en FITC 1 :400 (A) et 1 :200 (B). La réponse fluorescente reste donc proche du signal d'autofluorescence du PDMS natif (24.02 ± 0.34 u.a) sur l'ensemble des deux canaux malgré un facteur 2 entre les deux concentrations en anticorps fluorescent. Cela soutient la qualité de la protection fournie par le PEO dans le cadre d'un protocole de greffage prolongé impliquant différentes étapes de rinçages et greffages pouvant altérer l'intégrité du revêtement PEO.

Par ailleurs, le canal de PDMS natif non passivé et ayant suivi le même protocole montre une réponse fluorescente de 60.8 ± 3.98 u.a. Cela montre bien qu'en l'absence de passivation, le PDMS natif présente une réponse fluorescente particulièrement intense, signe de l'adsorption non spécifique des anticorps sur les surfaces non protégées et non silanisées.

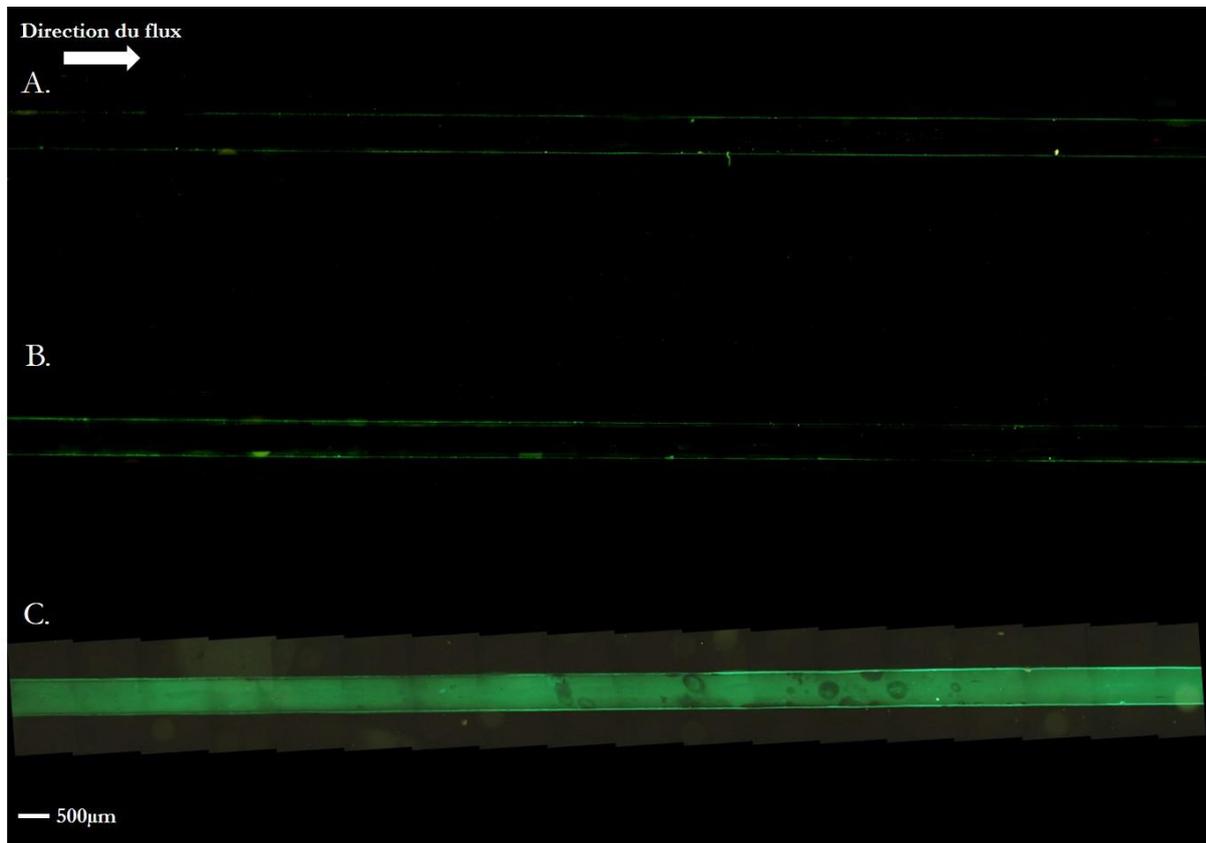


Figure 2 - 34. Photographie au microscope à fluorescence de deux canaux de PDMS traités avec le protocole PEO avant injection d'IgG de souris et détection par des anticorps anti-souris marqué FITC à (A) 1:400, (B) 1:200 en concentration, (C) Canal de PDMS natif dans les mêmes conditions. Observation 475 nm, grossissement X10, temps d'acquisition 1500 ms.

Aussi, le protocole PEO semble compatible avec le protocole de greffage des anticorps et indispensable pour les expériences d'immunodosage sous flux envisagées par la suite afin d'assurer une détection spécifique et sensible du TNF- α dans les puces microfluidiques.

Conclusion intermédiaire de la partie 3.2

Ainsi, nous avons développé un protocole de fabrication des puces microfluidiques comprenant l'assemblage de canaux de PDMS moulés avec les surfaces de PDMS silanisées dans les conditions sélectionnées dans la partie 2.2. Un protocole de protection des parois de PDMS non silanisées au sein des canaux a été optimisé afin de limiter l'adsorption non spécifique des protéines lors des étapes de greffages des immunocomplexes. Enfin, ce protocole s'est montré compatible avec un protocole de greffage d'IgG modèle de souris en conditions fluidiques. Désormais, le protocole de greffage des anticorps de capture doit être optimisé en conditions fluidiques afin d'améliorer les performances de détection au sein du canal en vue de l'immunodosage du TNF- α .

3.3. Greffage des anticorps sur les surfaces silanisées en conditions fluidiques

Les puces de PDMS constituées d'un capot silanisé (APTES 20%, 30 minutes) et de canaux moulés en PDMS et passivés contre l'adsorption non spécifique avec le protocole à base de PEO vont être utilisées pour le greffage d'anticorps de capture anti-TNF- α dans le but de réaliser un immunodosage en conditions fluidiques. Cependant, en vue d'assurer une bonne qualité de greffage des anticorps avec un recouvrement maximal de la surface tout en évitant une saturation de sites de greffage disponibles, le protocole doit être optimisé. Plusieurs paramètres comme les débits de greffage et de rinçage, la température, la concentration des anticorps de capture et de détection ont été investigués.

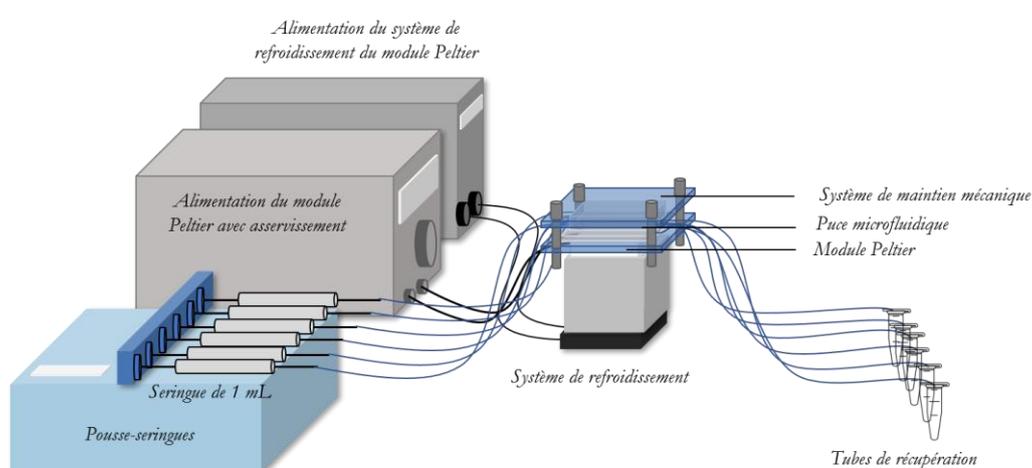


Figure 2 - 35. Schéma et photographie du montage des expériences microfluidiques de greffage d'anticorps

3.3.1. Protocole de greffage avec IgG modèles

Afin d'étudier les paramètres de greffage à partir d'un modèle simple de molécule, des IgG modèles de souris sont d'abord utilisés pour optimiser le greffage de la première couche d'anticorps sur le capot silanisé au sein du canal protégé au PEO.

Les expériences sont menées sous une hotte avec un module Peltier régulant en température les expériences. Les puces sont montées sur un support permettant de les adapter au module Peltier et d'assurer leur étanchéité en cas de collage défectueux. Les solutions sont injectées via un pousse-seringue multi-canal (6 seringues maximum) et calibré en débit volumique. Le montage est visible sur la Figure 2 - 35. Le protocole de greffage utilisé est décrit en annexe.

3.3.2. Optimisation du greffage des anticorps et de la détection

Plusieurs expériences de greffage ont permis d'identifier des points de contrôle importants pour la réussite du greffage et de la détection : la température, la concentration des anticorps FITC, la durée de l'étape de détection des anticorps FITC et le débit des étapes de rinçage

3.3.2.1. Étude de la température de greffage des IgG de souris et de la concentration des anticorps de détection conjugués au FITC

Tout d'abord, le contrôle en température des expériences est très important pour assurer un le greffage de la première couche d'anticorps. Les premiers tests effectués à température ambiante ont montré de mauvaises performances en matière de greffage, avec d'importantes variations entre les expériences et une réponse fluorescente non homogène dans le canal. L'installation d'un module Peltier s'est alors révélé indispensable.

Le protocole EDC/S-NHS est en effet plus stable à des températures proches de 4°C, réduisant la cinétique de l'hydrolyse des espèces intermédiaires instables formées. De même, en réduisant la température, les conformations moléculaires des anticorps sont plus stables et ils conservent davantage leur bioréactivité [50]. Les températures plus faibles pour l'étape de greffage après activation de la surface par EDC/S-NHS ont permis d'améliorer la qualité de la réaction de bioconjugaison.

Par ailleurs, la concentration en anticorps de détection conjugués au FITC est un paramètre important pour éviter une possible agrégation d'anticorps fluorescents dans le canal lors de la détection de la couche d'IgG de souris précédemment greffée. Les premiers tests effectués à des dilutions de 1:200 (consignes fournisseurs) montraient des signes d'accumulation des anticorps fluorescents en particulier sur les parois du canal. Une diminution progressive de la concentration à une dilution de 1:400 a permis d'atteindre une détection suffisamment sensible des anticorps sans signe majeur d'agrégation.

3.3.2.2. Etude de la durée de l'étape de détection

Par ailleurs, après avoir stabilisé la concentration en anticorps FITC, la durée de l'étape de détection avec ces anticorps reste un paramètre crucial. En effet, cela permet d'assurer que suffisamment d'anticorps soient détectés sans entraîner une détérioration de la réponse fluorescente si les temps de réaction sous flux se prolongent. Pour cela, 4 durées ont été testées avec une concentration de 1:400 après greffage d'IgG modèles sur un capot silanisé et des parois passivées au PEO.

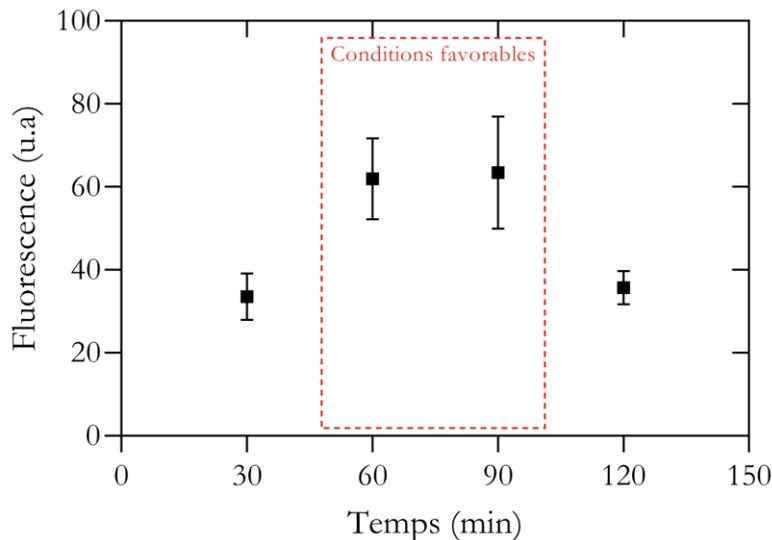


Figure 2 - 36. Optimisation de la durée de l'étape de détection des anticorps FITC (1:400) dans un canal microfluidique en PDMS avec un capot silanisé et greffé avec des IgG de souris à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et des parois traitées avec le protocole PEO. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) n'a pas été soustraite des valeurs indiquées.

Nous remarquons sur la Figure 2 - 36 que l'intensité du signal fluorescent atteint un maximum entre 1h et 1h30 de détection avec ~ 62 u.a. Pour des temps plus courts, la détection est insuffisante et la réponse est plus faible (33.51 ± 5.6 u.a.). Pour des temps plus longs, la réponse se dégrade (35.72 ± 4.05 u.a.), probablement car les anticorps fluorescents finissent par être élués sous les contraintes du cisaillement fluide. Une durée de 1h pour l'étape de détection nous semble donc optimale pour garantir une détection suffisamment sensible des anticorps greffés sans détérioration du signal.

3.3.2.3. Etude du débit et durée des étapes de rinçage

Lors de l'évaluation du protocole de passivation du PDMS dans le canal dans la partie 3.2.5, nous avons comparé le PDMS protégé à l'aide du PEO au PDMS natif non protégé contre l'adsorption non spécifique. Nous avons observé dans le cas du PDMS natif une réponse fluorescente intense de 60.8 ± 3.98 u.a., soit une réponse similaire à la puce aux canaux de PDMS silanisés et aux parois passivées.

Afin d'évaluer la stabilité relative de la réponse fluorescente des deux surfaces (natives et silanisées/passivées) et dans le but de confirmer les meilleures performances des puces silanisées, nous avons effectué un greffage d'IgG modèles dans les canaux de PDMS natif et les canaux de PDMS silanisé et passivé au PEO. Nous avons optimisé les étapes de rinçage dans le but de mieux nettoyer les molécules adsorbées sur le PDMS natif tout en conservant les molécules greffées sur le PDMS silanisé. Aussi, les débits des étapes de rinçage ont été multipliés par deux ($40 \mu\text{L}/\text{min}$ au lieu de $20 \mu\text{L}/\text{min}$) et leur durée allongée de 20 minutes à 30 minutes. Les résultats sont visibles sur la Figure 2 - 37.

Sur 4 canaux de PDMS natif (non silanisé et non passivé), nous avons observé d'importantes variations de la réponse au sein du canal et entre les canaux ($\text{RSD} = 20.8\%$), démontrant la faible

reproductibilité de l'immobilisation des anticorps par adsorption non spécifique. De plus, la moyenne de l'intensité fluorescente a chuté à 30.23 ± 6.28 u.a, soit la moitié de la réponse fluorescente avant l'optimisation du rinçage. Par ailleurs, nous avons identifié que l'étape de rinçage la plus importante correspond à l'étape suivant le greffage de la première couche d'anticorps, et non pas la dernière étape après détection par les anticorps FITC. Lors de cette première étape, les anticorps faiblement immobilisés sont éliminés, réduisant la possibilité d'être détectés par la suite par un anticorps fluorescent.

Sur 4 canaux de PDMS silanisé et passivé, la réponse fluorescente est restée stable le long du canal et plus reproductible entre les canaux (RSD = 14.4%) avec une moyenne d'intensité de 57.96 ± 8.3 u.a., soit une variation négligeable par rapport à la réponse avant optimisation du rinçage (61.96 ± 9.79 u.a.). Ainsi, la silanisation de la surface de PDMS permet un greffage des anticorps leur permettant d'être correctement détectés par les IgG FITC *via* le fragment Fab. A l'opposé, le PDMS natif entraîne une immobilisation des anticorps par physisorption ; ce qui peut altérer leur conformation et donc leur capacité à reconnaître spécifiquement une cible biologique. Enfin, l'importance du rinçage a été démontrée pour éliminer correctement la majorité des anticorps non greffés sur la surface et éviter une détection non spécifique des anticorps.

Ainsi, nous avons pu aboutir à un protocole de greffage optimisé permettant d'assurer une immobilisation homogène, stable et des paramètres de détection offrant une sensibilité adéquate pour la reconnaissance des anticorps en surface. Ces résultats ont alors été appliqués aux greffages des anticorps de capture anti-TNF- α .

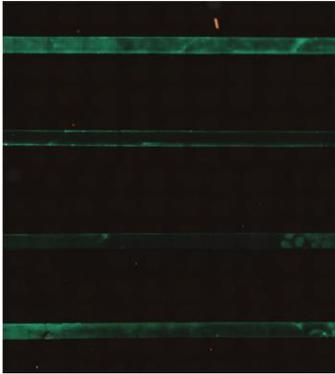
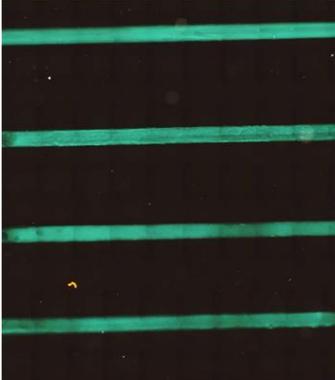
Echantillons	Fluorescence (u.a.)	Image de la surface (475 nm, 1500 ms)
Puce de PDMS natif	30.23 ± 6.28 RSD 20.8%	
Puce de PDMS silanisé et passivé	57.96 ± 8.3 RSD 14.4%	

Figure 2 - 37. Comparaison de la réponse fluorescente des canaux de PDMS natif et des canaux de PDMS silanisé et passivé pour le greffage d'IgG modèles de souris et détection fluorescente. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) n'a pas été soustraite des valeurs indiquées.

3.3.3. Application aux greffages des anticorps de capture anti-TNF- α

Le protocole optimisé de greffage des anticorps dans les canaux silanisés et passivés a ensuite été appliqué au greffage des anticorps de capture anti-TNF- α dans la perspective de l'immunodosage du TNF- α humain.

Tout d'abord, une étude de la concentration en anticorps pour la première couche de l'immunocomplexe a été menée. Pour cela, des puces de 6 canaux ont été fabriquées pour permettre l'étude de plusieurs concentrations en parallèle sur une même puce avec un capot silanisé. Les canaux ont été traités avec le protocole PEO et le capot a été silanisé selon le protocole optimisé dans la partie 2. Différentes concentrations en anticorps ont été étudiées : 0 $\mu\text{g/mL}$ (contrôle), 0.125, 0.250, 0.500, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0 et 20.0 $\mu\text{g/mL}$. Le même protocole de greffage d'anticorps que dans la partie 3.3.2 a été utilisé avec les étapes de rinçage optimisées.

Sur la Figure 2 - 38, nous pouvons observer une première phase linéaire ($R^2=0.97$) de 0 à 5 $\mu\text{g/mL}$ avec une réponse fluorescente suivant l'évolution de la concentration en anticorps de capture anti-TNF- α . Au-delà de 5 $\mu\text{g/mL}$ un phénomène de plateau similaire à celui observé en pleine plaque dans la partie 2.4 apparaît. Cependant, cet effet lié à une saturation de sites accessibles sur la surface de PDMS intervient à des concentrations supérieures à celles observées en pleine plaque, au-delà de 5 $\mu\text{g/mL}$ (contre 1 $\mu\text{g/mL}$ en pleine plaque).

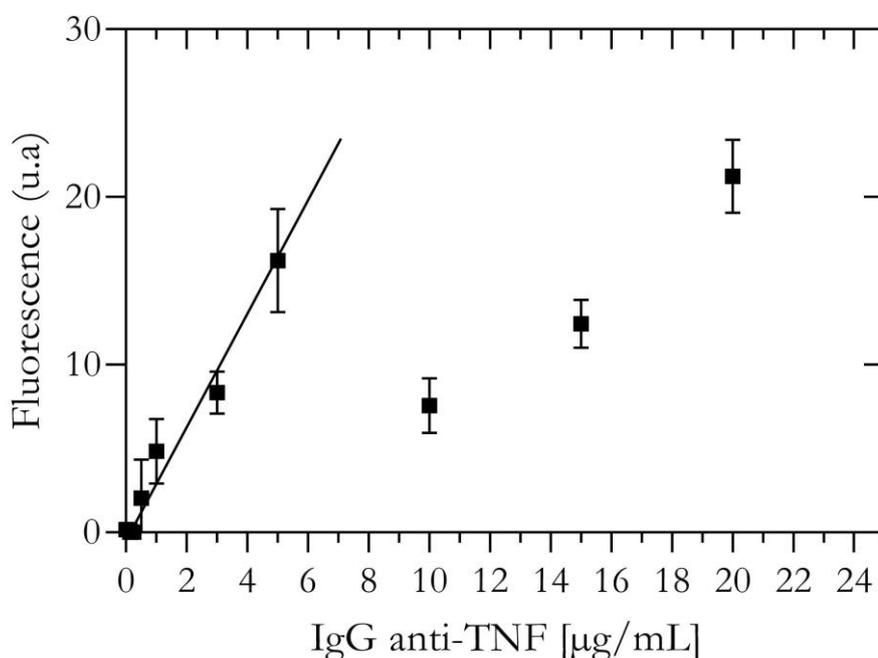


Figure 2 - 38. Évolution de l'intensité fluorescente en fonction de la concentration en anticorps de capture anti-TNF- α après greffage dans un canal de PDMS silanisé. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) a été soustraite des valeurs indiquées.

La baisse de l'intensité fluorescente au-delà de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ peut s'expliquer par un encombrement stérique de la surface qui gêne la reconnaissance et les interactions spécifiques des anticorps FITC avec les anticorps greffés. Cela modifierait alors la réponse fluorescente. La réponse augmente à nouveau à plus forte concentration d'anticorps greffés probablement car le ratio d'anticorps FITC/IgG greffés s'équilibre à nouveau et la gêne stérique diminue, permettant une meilleure répartition des anticorps fluorescents pour la détection de la couche greffée. Un phénomène similaire apparaissait déjà en pleine plaque sur les surfaces de PDMS.

Afin d'obtenir une densité d'anticorps de capture suffisante sur la surface, sans risque de saturation et de dégradation du signal fluorescent, nous avons choisi une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le greffage des anticorps de capture dans la suite des expériences d'immunodosage.

Sur le Tableau 2 - 4, la plage dynamique de l'intensité fluorescence est de 21.06 u.a contre 16.52 u.a en pleine plaque. Le protocole microfluidique permet d'améliorer la réponse de la surface, en discriminant mieux les variations de concentration en anticorps, attestant d'une bonne bioréactivité de la surface.

La transition en microfluidique apporte un contrôle et une qualité de greffage supérieure permettant une meilleure répartition des anticorps sur la surface et un meilleur drainage des molécules par les forces capillaires et fluidiques, bien que la surface soit plus petite (~6 fois plus faible entre la surface disponible dans le canal de 3 000 μm x 0.5 mm et la surface de PDMS de 1 cm^2). Le confinement de la surface silanisée ainsi que le greffage des anticorps sous flux apporte un bénéfice significatif à la capacité de greffage de la surface et donc au potentiel de détection de l'antigène par la suite.

Tableau 2 - 4. Synthèse des performances du protocole microfluidique avec le protocole pleine plaque pour le greffage des anticorps de capture sur le PDMS silanisé

	Protocole en pleine plaque	Protocole microfluidique
<i>Surface disponible</i>	1 cm^2	0.15 cm^2
<i>Plage dynamique de la fluorescence</i>	0-16.52	0-21.06
<i>Concentration de saturation des sites greffage accessibles</i>	~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.4. Immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques et évaluation des performances

Enfin, les puces de PDMS silanisées et passivées ont été utilisées pour l'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques. A partir de l'optimisation précédente sur la concentration d'anticorps de capture, une concentration de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été choisie afin de garantir un recouvrement maximal de la surface pour la capture du TNF- α sans occasionner une saturation des sites de greffage accessibles. La procédure est représentée sur la Figure 2 - 39. Le protocole détaillé est décrit en annexe. Les images de microscopie correspondant aux différentes concentrations sont représentées sur la Figure 2 - 40.

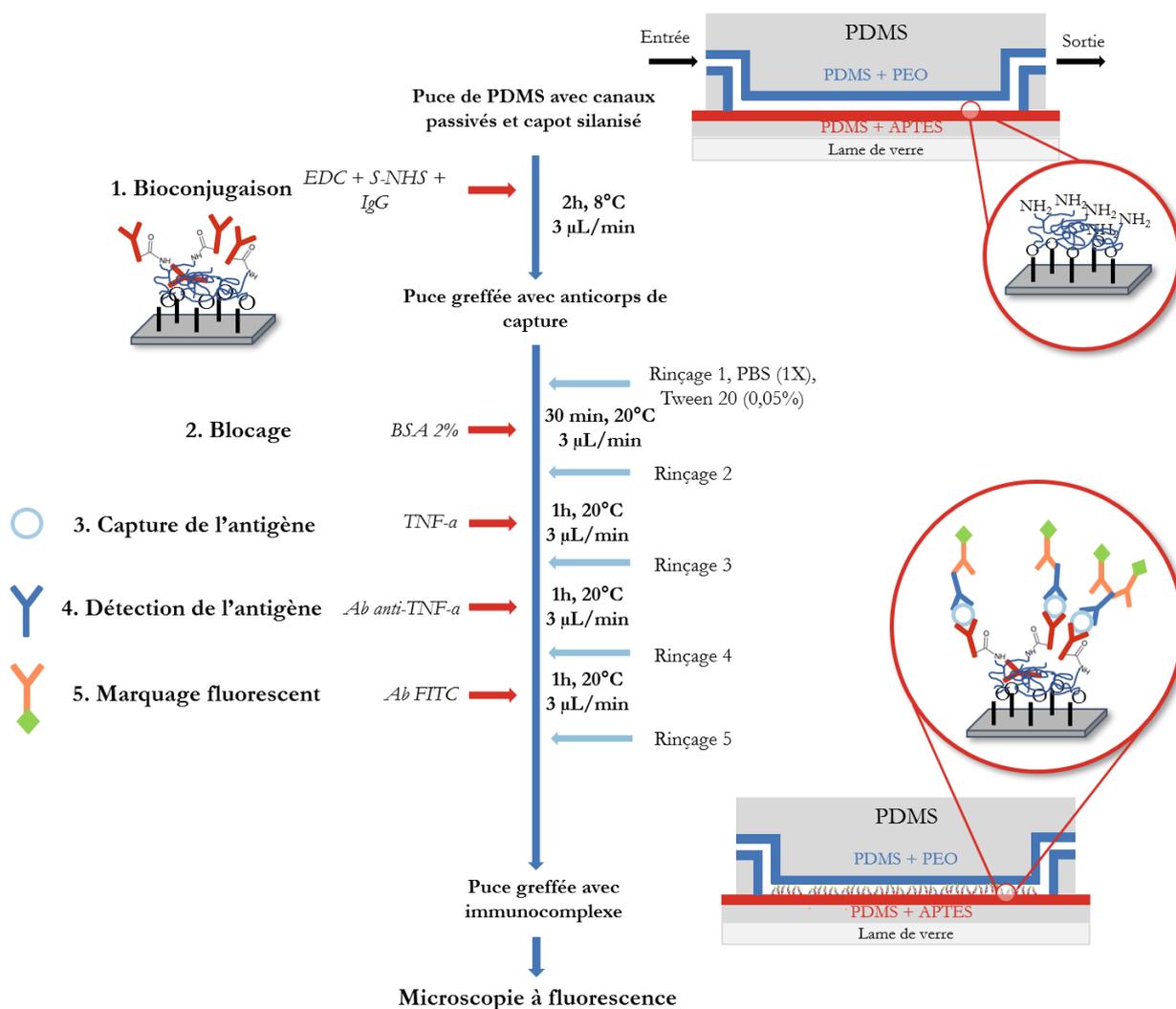


Figure 2 - 39. Schéma du protocole d'immunodosage en conditions fluidiques dans les puces de PDMS passivées et silanisées

La Figure 2 - 41 représente la courbe d'immunodosage du TNF- α humain réalisé dans les canaux pour différentes concentrations de TNF- α dans le PBS (1X) : 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 et 20.0 $\mu g/mL$. Comme pour les expériences d'immunodosage en pleine plaque, nous pouvons observer deux zones sur la courbe : une zone de 0 à 10.0 $\mu g/mL$ où la réponse fluorescente évolue de façon linéaire avec la concentration en TNF- α ($R^2=0.96$) ; une zone à partir de 10.0 $\mu g/mL$ où la réponse se stabilise autour de son maximum.

A basse concentration, les écarts-types des différents points sont très faibles, avec très peu de fluctuations de la réponse fluorescente ; ce qui constitue un point fort pour l'immunodosage pour des visées diagnostiques. En effet, les gammes de concentrations faibles sont les plus intéressantes pour les applications médicales comme expliqué dans le chapitre 1. Les réponses occasionnées par une faible variation de la concentration en TNF- α dans le milieu doivent pouvoir être distinguées les unes des autres.

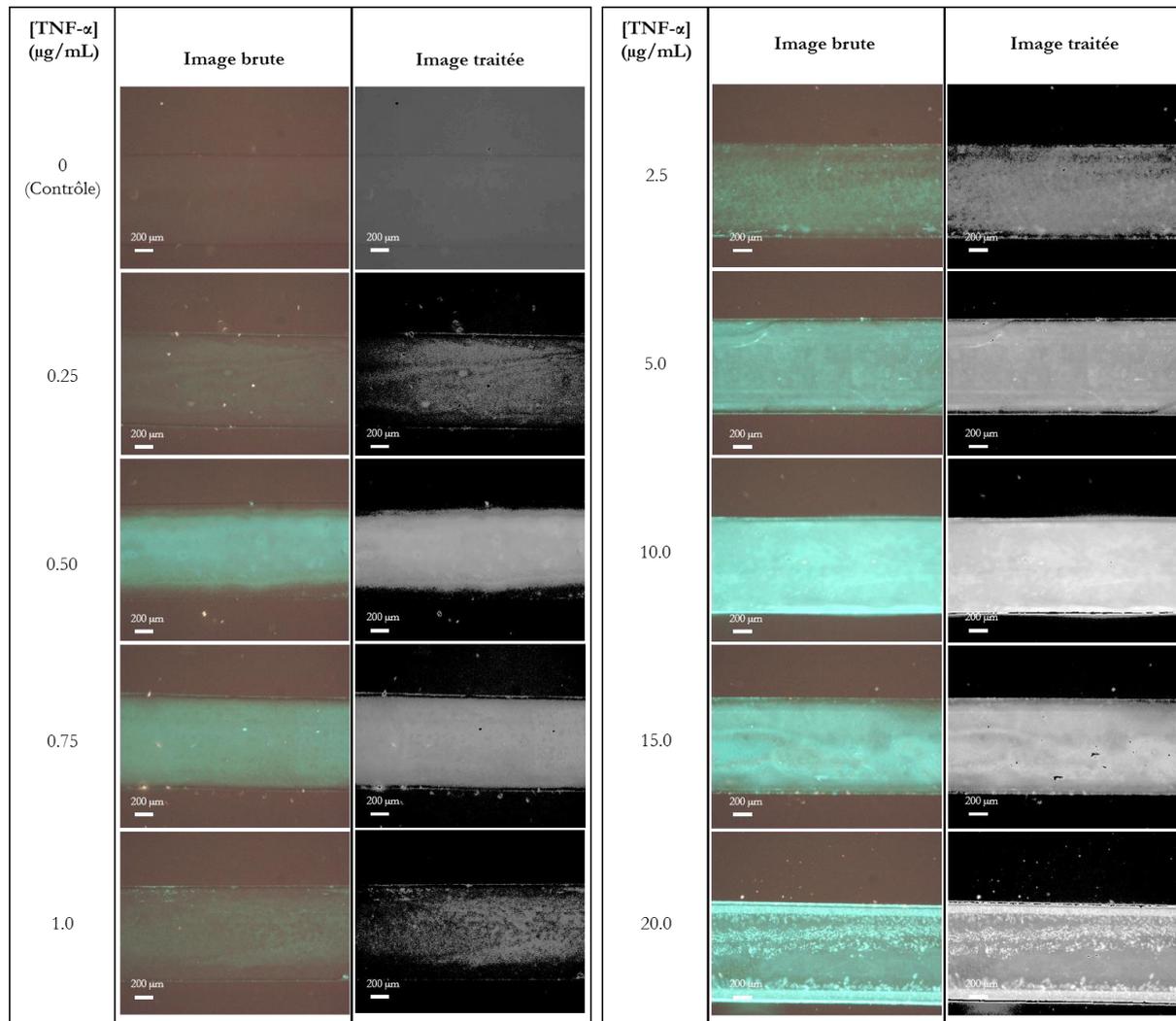


Figure 2 - 40. Série d'images de microscopie à fluorescence d'un canal de PDMS silanisé et passivé au PEO pour l'immunosage du TNF- α (Exc 475 nm, X10, 1500 ms)

Par ailleurs, une limite de détection de 0.26 $\mu\text{g/mL}$ (14.9 nM) a été obtenue à partir de la droite de régression, soit une limite de détection plus de deux fois plus faibles qu'en pleine plaque (0.55 $\mu\text{g/mL}$, 31.6 nM). Enfin, le contrôle réalisé en retirant la couche d'anticorps de capture montre une réponse fluorescente similaire au contrôle sans TNF- α et à l'autofluorescence du PDMS, confirmant la haute spécificité de la détection et la faible affinité des molécules pour la surface en l'absence d'anticorps de capture.

A haute concentration la surface perd en stabilité et la réponse fluorescente se stabilise autour d'un maximum vers 27 u.a. Les variations autour du plateau de fluorescence sont plus limitées qu'en pleine plaque. La microfluidique et le confinement de la surface semblent conférer de nombreux avantages pour améliorer les performances de la détection. Le meilleur drainage des molécules par les forces fluidiques et capillaires limite les interactions non spécifiques entre molécules et donc les probabilités d'encombrement. La synthèse des performances en pleine plaque et en microfluidique est réalisée dans le Tableau 2 - 5.

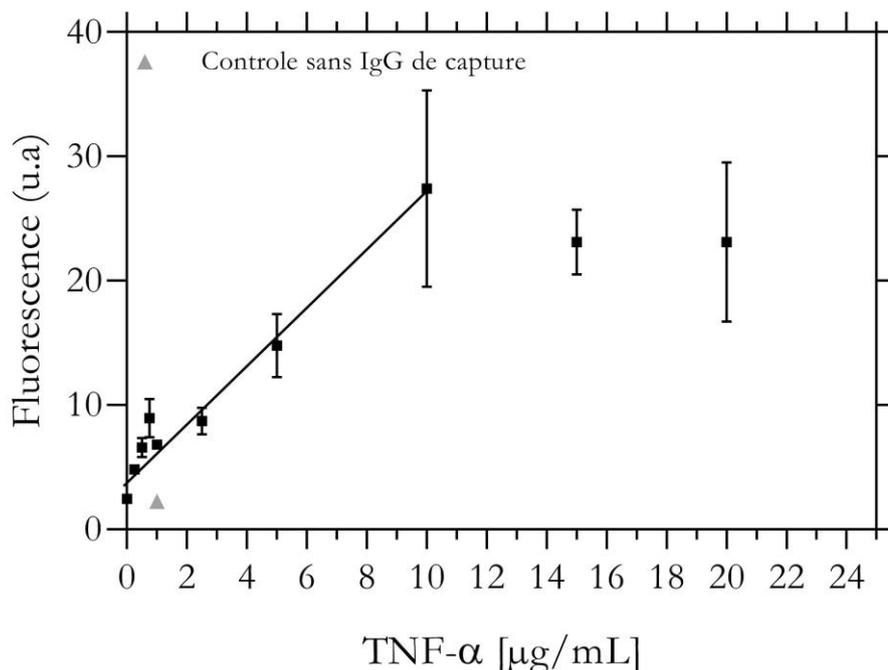


Figure 2 - 41. Courbe d'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques dans une puce de PDMS composé d'un capot de PDMS silanisé et de canaux de PDMS passivés au PEO. La contribution du PDMS natif (autofluorescence) a été soustraite des valeurs indiquées.

Ainsi, les différentes optimisations des protocoles de passivation et greffage en conditions fluidiques ont permis d'améliorer les performances de capture et détection du TNF- α au sein de la puce. De plus, le confinement de la surface dans le canal semble permettre un meilleur contact entre les solutions et la surface durant les différentes étapes, apportant une meilleure stabilité et réactivité par rapport aux résultats en pleine plaque. Nous avons ainsi démontré la faisabilité d'un immunodosage du TNF- α au sein d'une puce microfluidique constituée d'une surface de PDMS silanisé et de PDMS protégé contre l'adsorption non spécifique avec du PEO. Les performances du dispositif en termes de spécificité et stabilité sont suffisantes pour garantir la fiabilité des analyses. Enfin, la sensibilité de la détection fluorescente permet d'atteindre une limite de détection tout à fait appréciable et comparable à d'autres dispositifs microfluidiques [51–53]. Néanmoins, cette sensibilité devra être améliorée afin d'atteindre des niveaux de détection applicables aux échantillons biologiques. Pour cela, la détection par fluorescence devra être remplacée par un système de détection plus sensible (magnétique par exemple).

Tableau 2 - 5. Synthèse des performances de détection du TNF- α par immunodosage en pleine plaque sur PDMS silanisé et en microfluidique dans des canaux de PDMS silanisés et passivés.

	Protocole en pleine plaque	Protocole microfluidique
<i>Surface disponible</i>	1 cm ²	0.15 cm ²
<i>Plage dynamique de la fluorescence</i>	0-20.38	0-25.0
<i>Concentration de saturation des sites greffage accessibles</i>	~1 μg/mL	~5 μg/mL
<i>Limite de détection</i>	0.55 μg/mL (31.6 nM)	0.26 μg/mL (14.9 nM)

Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre nous avons abordé la fonctionnalisation du PDMS comme matériau support du circuit microfluidique intégré au dispositif visé dans cette thèse. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la conception de la chambre de détection biosensible pour la quantification du TNF- α par microscopie à fluorescence.

Dans cet objectif, nous avons d'abord introduit les caractéristiques du PDMS et les méthodes de fabrication et structuration utilisées. Nous avons ensuite présenté différentes techniques de caractérisation pour déterminer le profil physico-chimique du matériau : sa mouillabilité, sa composition élémentaire, sa structure chimique, sa morphologie et sa réponse fluorescente. Ces techniques ont alors été utilisées pour suivre l'évolution du matériau durant les différentes étapes de fonctionnalisation.

A ce titre, nous avons développé un protocole de silanisation du PDMS par un aminosilane et aboutit à des conditions optimales de silanisation pour assurer une surface réactive homogène, stable et présentant des groupements amines disponibles pour le greffage des anticorps. Les surfaces de PDMS ainsi préparées ont été appliquées à l'immunodosage du TNF- α en pleine plaque, atteignant une limite de détection de 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (31.6 nM).

Afin de gagner en contrôle et en stabilité, tout en réduisant la quantité de réactifs utilisés et les temps de réaction, les surfaces silanisées ont été assemblées avec des canaux microfluidiques. Un protocole de passivation du PDMS contre l'adsorption non spécifique a alors été mis au point afin d'assurer une détection plus stable et spécifique des antigènes.

Par la suite, un protocole de greffage des anticorps en conditions fluidiques a été développé sur les surfaces silanisées avec des performances remarquables par rapport au PDMS natif. Nous avons observé une meilleure reproductibilité dans l'immobilisation des anticorps, une meilleure stabilité de la surface et donc davantage de sensibilité dans la détection (+ 50% plus sensible).

Enfin, les puces microfluidiques silanisées et passivées ont été appliquées à l'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques. Une limite de détection de 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (14.9 nM) a été obtenue. Par rapport aux résultats en pleine plaque, les puces microfluidiques ont notamment démontré une plus grande plage dynamique en fluorescence avec moins de fluctuations, en particulier aux faibles concentrations. De même, les fluctuations observées à hautes concentrations semblent avoir diminué avec l'apport de la microfluidique. Ainsi, l'intégration des surfaces silanisées en microfluidique a permis d'assurer de meilleures performances de détection du TNF- α en termes de reproductibilité, stabilité, spécificité et sensibilité.

Par la suite, la chambre de détection composée de PDMS silanisé sera biofonctionnalisée par des anticorps anti-TNF- α et servira à l'immobilisation des immunocomplexes constitués des billes magnétiques ayant capturé le TNF- α en solution. Cette capture par les billes magnétiques fonctionnalisées, abordée dans le chapitre suivant, sera assistée par les microbobines intégrées fabriquées dans le chapitre 4.

Bibliographie

- [1] Huheey; James E., Keiter; Ellen A., Keiter; Richard L., *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4th ed., 1993.
- [2] D.J. Campbell, K.J. Beckman, C.E. Calderon, P.W. Doolan, R.M. Ottosen, A.B. Ellis, G.C. Lisensky, Replication and Compression of Bulk and Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer, *J. Chem. Educ.* 75 (1999) 537–541.
- [3] T.M. Squires, S.R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, *Rev. Mod. Phys.* 77 (2005).
- [4] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford, 2005.
- [5] D.A. Khodakov, L.D. Thredgold, C.E. Lenehan, G.A. Andersson, H. Kobus, A. V. Ellis, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannels with DNA capture-probes for potential use in microfluidic DNA analysis systems, in: *Smart Nano-Micro Mater. Devices*, 2011: p. 82040J. doi:10.1117/12.903208.
- [6] J.H.L. Beal, A. Bubendorfer, T. Kemmitt, I. Hoek, W. Mike Arnold, A rapid, inexpensive surface treatment for enhanced functionality of polydimethylsiloxane microfluidic channels, *Biomicrofluidics*. 6 (2012). doi:10.1063/1.4740232.
- [7] R. Zargar, J. Nourmohammadi, G. Amoabediny, Preparation, characterization, and silanization of 3D microporous PDMS structure with properly sized pores for endothelial cell culture, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63 (2016) 190–199. doi:10.1002/bab.1371.
- [8] A. Siddique, T. Meckel, R.W. Stark, S. Narayan, Improved cell adhesion under shear stress in PDMS microfluidic devices, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 150 (2017) 456–464. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.11.011.
- [9] J. Nourmohammadi, T. Hajibabaei, G. Amoabediny, S.H. Jafari, N. Salehi-Nik, Aminosilane layer formation inside the PDMS tubes improves wettability and cytocompatibility of human endothelial cells, *Trends Biomater. Artif. Organs*. 29 (2015) 123–131. <https://www.researchgate.net/publication/278753721>.
- [10] Y.J. Chuah, S. Kuddannaya, M.H.A. Lee, Y. Zhang, Y. Kang, The effects of poly(dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 383–390. doi:10.1039/c4bm00268g.
- [11] L. Yu, C.M. Li, Y. Liu, J. Gao, W. Wang, Y. Gan, Flow-through functionalized PDMS microfluidic channels with dextran derivative for ELISAs, *Lab Chip*. 9 (2009) 1243–1247. doi:10.1039/b816018j.
- [12] F.T. Zhang, L. Xu, J.H. Chen, B. Zhao, X.Z. Fu, R. Sun, Q. Chen, C.P. Wong, Electroless Deposition Metals on Poly(dimethylsiloxane) with Strong Adhesion As Flexible and Stretchable Conductive Materials, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 2075–2082. doi:10.1021/acsami.7b15726.
- [13] D. Lin, Q. Zhao, M. Yan, Surface modification of polydimethylsiloxane microfluidic chips by polyamidoamine dendrimers for amino acid separation, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016). doi:10.1002/app.43580.
- [14] J.B. Orhan, V.K. Parashar, J. Flueckiger, M.A.M. Gijs, Internal modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels with a borosilicate glass coating, *Langmuir*. 24 (2008) 9154–9161. doi:10.1021/la801317x.
- [15] F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, J.C. Olivo-Marin, Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research, *Nat. Methods*. 9 (2012) 690–696. doi:10.1038/nmeth.2075.
- [16] J.A. Howarter, J.P. Youngblood, Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane, *Langmuir*. 22 (2006) 11142–11147. doi:10.1021/la061240g.
- [17] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6544–6554. doi:10.1021/ac0346712.
- [18] M. Zhu, M.Z. Lerum, W. Chen, How to prepare reproducible, homogeneous, and

- hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica, *Langmuir*. 28 (2012) 416–423. doi:10.1021/la203638g.
- [19] V.C. Pinto, G. Minas, M. Correia-Neves, PDMS biofunctionalization study for the development of a microfluidic device: Application to salivary cortisol, in: *Proc. - 2015 IEEE 4th Port. Meet. Bioeng. ENBENG 2015*, 2015. doi:10.1109/ENBENG.2015.7088852.
- [20] R. Khnouf, D. Karasneh, B.A. Albiss, Protein immobilization on the surface of polydimethylsiloxane and polymethyl methacrylate microfluidic devices, *Electrophoresis*. 37 (2016) 529–535. doi:10.1002/elps.201500333.
- [21] L. Yu, C.M. Li, Q. Zhou, J.H.T. Luong, Poly(vinyl alcohol) functionalized poly(dimethylsiloxane) solid surface for immunoassay, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 281–284. doi:10.1021/bc060108p.
- [22] V. Sunkara, Y.K. Cho, Investigation on the mechanism of aminosilane-mediated bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane), *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 4 (2012) 6537–6544. doi:10.1021/am3015923.
- [23] J.L. Fritz, M.J. Owen, Hydrophobic recovery of plasma-treated polydimethylsiloxane, *J. Adhes.* 54 (1995) 33–45. doi:10.1080/00218469508014379.
- [24] X. Zeng, G. Xu, Y. Gao, Y. An, Surface wettability of (3-Aminopropyl)triethoxysilane self-assembled Monolayers, *J. Phys. Chem. B*. 115 (2011) 450–454. doi:10.1021/jp109259b.
- [25] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.F. Lambert, S. Boujday, Silane layers on silicon surfaces: Mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption, *Langmuir*. 28 (2012) 656–665. doi:10.1021/la2036778.
- [26] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey, D. Johnson, On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces, 1990. doi:10.1016/0021-9797(90)90038-P.
- [27] F. Zhang, M.P. Srinivasan, Self-Assembled Molecular Films of Aminosilanes and Their Immobilization Capacities, *Langmuir*. 20 (2004) 2309–2314. doi:10.1021/la0354638.
- [28] J. Goldstein, D.E. Newbury, D.C. Joy, C.E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, J.R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis - | Joseph Goldstein | Springer, Springer US, 2003*. doi:10.1007/978-1-4615-0215-9.
- [29] D.A. Long, *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts* George Socrates John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, Third Edition, 2001. Price £135, John Wiley, 2004. doi:10.1002/jrs.1238.
- [30] J. Nourmohammadi, T. Hajibabaei, G. Amoabediny, S.H. Jafari, N. Salehi-Nik, Aminosilane layer formation inside the PDMS tubes improves wettability and cytocompatibility of human endothelial cells, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/278753721>.
- [31] R.M. Pasternack, S.R. Amy, Y.J. Chabal, Attachment of 3-(aminopropyl)triethoxysilane on silicon oxide surfaces: Dependence on solution temperature, *Langmuir*. 24 (2008) 12963–12971. doi:10.1021/la8024827.
- [32] J. Kim, P. Seidler, L.S. Wan, C. Fill, Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates, *J. Colloid Interface Sci.* 329 (2009) 114–119. doi:10.1016/j.jcis.2008.09.031.
- [33] G.C. Santini, C. Potrich, L. Lunelli, L. Vanzetti, S.L. Marasso, M. Cocuzza, F.C. Pirri, C. Pederzoli, miRNA purification with an optimized PDMS microdevice: Toward the direct purification of low abundant circulating biomarkers, *Biophys. Chem.* 229 (2017) 142–150. doi:10.1016/j.bpc.2017.04.009.
- [34] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed., 2013.
- [35] N.S. Lipman, L.R. Jackson, L.J. Trudel, F. Weis-Garcia, *Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources*, n.d. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/258/738903>.
- [36] P.N. Nelson, G.M. Reynolds, E.E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos, P.G. Murray, *Demystified. .. Monoclonal antibodies*, 2000.

- [37] W. Morikawa, R. Liki, T. Terano, A. Funatsu, H. Sugiuchi, Y. Uji, H. Okabe, Comparison of Monoclonal and Polyclonal Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA) Assays for Serum Lp(a) and Differences in Reactivities to Lp(a) Phenotypes, 1995.
- [38] G. Liu, M. Qi, M.R. Hutchinson, G. Yang, E.M. Goldys, Recent advances in cytokine detection by immunosensing, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 810–821. doi:10.1016/j.bios.2016.01.020.
- [39] J.H. Seo, L.J. Chen, S. V. Verkhoturov, E.A. Schweikert, A. Revzin, The use of glass substrates with bi-functional silanes for designing micropatterned cell-secreted cytokine immunoassays, *Biomaterials.* 32 (2011) 5478–5488. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.026.
- [40] S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, E. Delamarche, High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor α using microfluidic systems, *Lab Chip.* 4 (2004) 563–569. doi:10.1039/b408964b.
- [41] F.G. Bellagambi, A. Baraket, A. Longo, M. Vatteroni, N. Zine, J. Bausells, R. Fuoco, F. Di Francesco, P. Salvo, G.S. Karanasiou, D.I. Fotiadis, A. Mencias, A. Errachid, Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure, *Sensors Actuators, B Chem.* 251 (2017) 1026–1033. doi:10.1016/j.snb.2017.05.169.
- [42] H.S. Chuang, Y.J. Chen, H.P. Cheng, Enhanced diffusometric immunosensing with grafted gold nanoparticles for detection of diabetic retinopathy biomarker tumor necrosis factor- α , *Biosens. Bioelectron.* 101 (2018) 75–83. doi:10.1016/j.bios.2017.10.002.
- [43] A. Marques-Deak, G. Cizza, F. Eskandari, S. Torvik, I.C. Christie, E.M. Sternberg, T.M. Phillips, Measurement of cytokines in sweat patches and plasma in healthy women: Validation in a controlled study, *J. Immunol. Methods.* 315 (2006) 99–109. doi:10.1016/j.jim.2006.07.011.
- [44] X. Younan, G.M. Whitesides, Soft lithography, *Angew. Chemie Int. Ed.* 37 (1998) 550–575.
- [45] H.H. Cao, The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications, Université Paris Saclay, 2016. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01350864>.
- [46] O. Lefebvre, Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques, Université Paris Saclay, 2018.
- [47] J. Preisler, E.S. Yeung, Characterization of Nonbonded Poly(ethylene oxide) Coating for Capillary Electrophoresis via Continuous Monitoring of Electroosmotic Flow, 1996.
- [48] N.A. Alcantar, E.S. Aydil, J.N. Israelachvili, Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 343–351.
- [49] J.H. Han, J.Y. Yoon, Reusable, polyethylene glycol-structured microfluidic channel for particle immunoassays, *J. Biol. Eng.* 3 (2009). doi:10.1186/1754-1611-3-6.
- [50] J. Gibbs, M. Vessels, M. Rothenberg, Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules for ELISA Assays, 2017.
- [51] Y. Liu, D. Yang, T. Yu, X. Jiang, Incorporation of electrospun nanofibrous PVDF membranes into a microfluidic chip assembled by PDMS and scotch tape for immunoassays, *Electrophoresis.* 30 (2009) 3269–3275. doi:10.1002/elps.200900128.
- [52] G. Sui, J. Wang, C.C. Lee, W. Lu, S.P. Lee, J. V. Leyton, A.M. Wu, H.R. Tseng, Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5543–5551. doi:10.1021/ac060605z.
- [53] W. Schrott, M. Nebyla, M. Přibyl, D. Šnita, Detection of immunoglobulins in a laser induced fluorescence system utilizing polydimethylsiloxane microchips with advanced surface and optical properties, *Biomicrofluidics.* 5 (2011). doi:10.1063/1.3553006.
- [54] F. Meurens, A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif, V. Gerdt, The pig: A model for human infectious diseases, *Trends Microbiol.* 20 (2012) 50–57. doi:10.1016/j.tim.2011.11.002.

Chapitre 3

Etude du greffage d'anticorps sur des billes magnétiques
pour l'immunocapture du TNF- α

Sommaire

Introduction.....	165
1. Billes magnétiques pour le greffage des anticorps	166
1.1. Propriétés des billes magnétiques étudiées.....	166
1.2. Etude de la bioréactivité des billes.....	167
1.2.1. Densité de greffage et orientation des anticorps sur les billes.....	167
1.2.2. Méthodes existantes pour déterminer la bioréactivité des billes.....	169
2. Développement d'une méthode de caractérisation de la bioréactivité des billes magnétiques.....	175
2.1. Digestion enzymatique des anticorps	175
2.2. Greffage des anticorps sur les billes	177
2.3. Analyse par SEC-FLD des fragments d'anticorps.....	177
2.3.1. Validation de la méthode	177
2.3.2. Etude de l'influence des conditions de greffage des billes sur le signal FLD.....	178
2.3.3. Contribution du signal de l' <i>Ides</i> à la détection FLD.....	181
2.4. Caractérisation du greffage des anticorps sur les billes magnétiques	184
2.4.1. Estimation de la densité d'anticorps greffés sur les billes.....	184
2.4.2. Evaluation de l'orientation des anticorps sur les différents types de billes magnétiques.....	186
3. Application à l'immunodosage et l'immuno-capture du TNF-α.....	189
3.1. Immunodosage du TNF- α sur billes Ts et Protéine G.....	189
3.1.1. Immunodosage sur billes Ts	190
3.1.2. Immunodosage sur billes Protéine G.....	191
3.2. Immuno-capture et élution du TNF- α sur billes Ts, COOH et Protéine G	191
Conclusion du chapitre 3.....	194
Bibliographie.....	195

Introduction

Dans le chapitre 1, nous avons présenté le dispositif visé dans cette thèse pour le dosage du TNF- α par une immunocapture sur des billes magnétiques. Nous avons également détaillé les différents avantages liés à l'utilisation des billes magnétiques dans les dispositifs microfluidiques et pour des applications biologiques. Ces billes peuvent être synthétisées en laboratoire ou bien plus simplement achetées chez des fournisseurs variés, proposant des tailles et propriétés différentes. Les billes magnétiques commerciales permettent notamment de garantir des propriétés géométriques contrôlées ainsi qu'un large choix dans les propriétés chimiques de surface ; ce qui en fait d'excellent support d'immobilisation de biomolécules.

Nous nous sommes donc intéressés à différentes billes commerciales, couramment utilisées pour l'immobilisation d'anticorps à leur surface. Une fois les billes greffées, elles peuvent être employées pour l'immunocapture ou l'immunodosage de protéines. Les performances des immunodosages/immunocapture sur bille dépendent de la qualité du greffage de la protéine sur la surface, et notamment du nombre d'anticorps sur la bille et leur orientation. Il est donc nécessaire de développer une méthode fiable pour la caractérisation de l'immobilisation des anticorps sur les billes magnétiques.

Ainsi, dans ce troisième chapitre, nous aborderons tout d'abord les propriétés des billes commerciales étudiées ainsi que les méthodes existantes pour étudier leur bioréactivité, c'est-à-dire leur capacité à réagir avec un anticorps donné. Puis, nous présenterons une méthode originale développée au cours de cette thèse pour caractériser les billes magnétiques greffées avec des anticorps et ainsi sélectionner le type de bille le plus adapté pour l'application visée. Enfin, nous validerons notre analyse et le choix de la bille en l'appliquant à l'immunocapture du TNF- α .

1. Billes magnétiques pour le greffage des anticorps

Dans la perspective d'une intégration au sein du dispositif microfluidique d'immunodosage visé dans cette thèse, la question du choix des billes magnétiques à utiliser et leur efficacité s'est posée. Dans le cadre de cette thèse, parmi la variété de biomolécules et fonctions chimiques disponibles sur les billes magnétiques commercialisées (voir partie 3 du chapitre 1), nous nous sommes intéressés en particulier aux billes recommandées pour l'immobilisation d'anticorps. Nous avons utilisé les billes Dynabeads de la gamme MyOne de diamètre 1 μm , proposée par Invitrogen. Le choix du diamètre influera sur les performances de greffage et les performances magnétiques, mais aussi sur le comportement de la bille dans un fluide (sédimentation, agrégation, ...). Aussi, la taille de 1 μm choisie nous a semblé un bon compromis entre ces différents critères. Nous allons donc présenter les propriétés des différentes billes de 1 μm étudiées au cours de cette thèse.

1.1. Propriétés des billes magnétiques étudiées

Les billes magnétiques Dynabeads existent sous plusieurs formats avec différents groupes fonctionnels adaptés aux greffages d'anticorps : acide carboxylique, tosyl, streptavidine, protéine G. Ce dernier type de bille, bien que très utilisé, n'est pas proposé dans la gamme Dynabeads à un diamètre de 1 μm . Nous avons donc opté pour une autre référence proposée par Invitrogen, les billes protéines G de Pierce, disponibles au diamètre désiré. Un récapitulatif des propriétés des billes étudiées est fourni par le **Tableau 3 - 1**.

Tableau 3 - 1. Propriétés des différentes billes magnétiques commerciales utilisées fournies par Invitrogen

	Dynabeads MyOne COOH	Dynabeads MyOne Ts	Dynabeads MyOne Streptavidine	Pierce Protéine G
<i>Taille</i>	1 μm	1 μm	1 μm	1 μm
<i>Densité</i>	1.8 g/cm ³ (matière sèche)	1.8 g/cm ³ (matière sèche)	1.8 g/cm ³ (matière sèche)	2.0 g/cm ³
<i>Mécanisme</i>	Conjugaison entre acide carboxylique et groupement amines ou sulphydryls des protéines	Groupement tosyl crée une liaison covalente avec groupes sulphydryl ou amine primaire	Affinité entre la streptavidine de surface et une entité biotinylée	Protéine G recombinante en surface avec 2 domaines de liaisons à la région Fc des anticorps
<i>Chimie de surface</i>	Hydrophile	Hydrophobe	Hydrophobe	Hydrophile
<i>Capacité de capture</i>	10-15 μg d'IgG/mg de billes	15-20 μg d'IgG/mg de billes	20 μg d'IgG/mg de billes	>60 μg d'IgG de lapin/mg de billes
<i>Fonctionnalités actives</i>	400-800 $\mu\text{mol/g}$ de billes	40-60 $\mu\text{mol/g}$ de billes	>1,3 $\mu\text{mol/g}$ de billes	Non disponible

Nous pouvons noter que les billes étudiées présentent des chimies de surfaces variées avec des mécanismes de greffage différents, pour des propriétés physiques (densité, taille) similaires. Il s'agit donc ici de comparer les billes sur des critères bien précis conditionnant leur bioréactivité, c'est-à-dire leur capacité à se lier à des biomolécules données (ici des anticorps), tout en assurant leur

intégrité et une détection optimale. L'étude des billes sur d'autres paramètres comme leur aimantation, leur facilité de manipulation, n'a pas été menée, bien que cela influencera également les performances du dispositif final.

1.2. Etude de la bioréactivité des billes

Le terme bioréactivité utilisé dans cette thèse désigne la capacité d'un élément donné à être biologiquement ou biochimiquement réactif. S'intéresser à la bioréactivité d'une bille greffée nécessite de bien connaître le rôle biologique des molécules fixées en surface (ex : protéines, acides nucléiques). En effet, l'étude de l'activité d'une enzyme différera de l'étude de la bioréactivité d'un anticorps, d'un brin d'ADN, d'une cellule...

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons donc à la biofonctionnalisation des billes magnétiques. Cela consiste alors à étudier l'activité biologique des anticorps après leur immobilisation à la surface des billes magnétiques. Lorsqu'un anticorps est fixé à une surface comme une bille, le comportement de l'anticorps à l'interface bille-solution ainsi que son orientation par rapport à la surface vont influencer ses performances de reconnaissance. Enfin, au sein d'une bille, plusieurs milliers de molécules d'anticorps peuvent potentiellement se fixer à sa surface. Il conviendra alors d'évaluer également le taux de recouvrement de la surface par les anticorps.

1.2.1. Densité de greffage et orientation des anticorps sur les billes

Pour mieux comprendre l'importance de l'orientation et de la densité des anticorps sur une surface, il est d'abord nécessaire de comprendre les propriétés d'un anticorps. Un anticorps (ou immunoglobuline, Ig) est une classe spécifique de protéines qui est capable de reconnaître spécifiquement une cible donnée. Comme toute protéine, sa fonction dépend de sa structure tridimensionnelle, et donc de la nature des acides aminés qui la composent, des interactions entre eux et avec l'environnement extérieur. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux IgG (les plus répandues chez l'homme) qui ont une masse moléculaire moyenne de 150 kDa et présentent une structure en Y, (voir **Figure 3 - 1**). Cette structure lui confère une flexibilité lui permettant deux tâches :

- Se lier à une large variété d'antigènes par les deux chaînes constituant le haut du Y. Ces chaînes varient d'un anticorps à l'autre, et sont nommées « fragment Fab » pour « Fragment antigen binding ». Ce sont bien ces fragments qui sont responsables de la capture d'un antigène donné et leur nature conditionne la spécificité de la reconnaissance. La grande variabilité de ce fragment, et en particulier de la région variable comprenant les domaines V_H et V_L (voir **Figure 3 - 1**), permet aux anticorps de reconnaître une grande variété d'antigènes. Ce sont ces zones qui assurent la grande spécificité d'un anticorps pour un antigène donné ;
- Se lier à un nombre limité de molécule effectrice et de cellules par la base du Y, dont la structure varie peu, lui conférant le nom de « fragment Fc » pour « fragment cristallisable ». Il est identique chez tous les anticorps du même isotype (c'est-à-dire, la classe d'anticorps parmi les IgG, IgA, IgD, IgE et IgM).

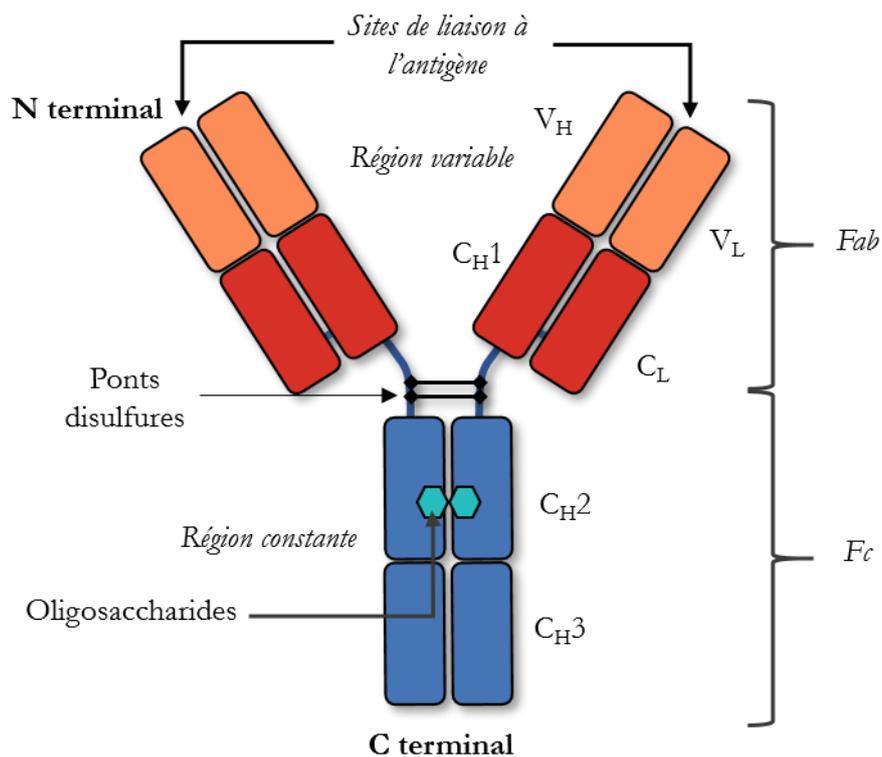


Figure 3 - 1. Structure d'une immunoglobuline G (IgG) : Fab, fragment antigen binding ; Fc, fragment cristallisable ; C_L, domaine constant, chaîne légère ; V_L, domaine variable, chaîne légère ; C_H, domaine constant, chaîne lourde (1 à 3) ; V_H, domaine variable, chaîne lourde ; C terminal, terminaison carboxy ; N terminal, terminaison amine.

Les IgG sont les anticorps les plus courants et se composent de 4 chaînes (deux chaînes lourdes et deux chaînes légères) liées par des ponts disulfures provenant des acides aminés cystéines. Chaque fragment Fab est composé d'une chaîne légère et de la moitié de la chaîne lourde. Le fragment Fc est formé de deux moitiés de la chaîne lourde. Les chaînes légères sont liées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures et les chaînes lourdes sont liées entre elles par une chaîne polypeptidique appelée « région charnière » conférant la flexibilité précédemment mentionnée des anticorps, nécessaire à leur bon fonctionnement. Enfin, des chaînes d'oligosaccharides résultant du processus de glycosylation du fragment Fc occupent généralement le domaine C_{H2}. Ces oligosaccharides (ou glycans) ont un rôle très important dans la communication avec les cellules effectrices, mais aussi dans la pharmacocinétique de l'anticorps et sa stabilité. C'est également ces glycans qui maintiennent les deux chaînes du fragment Fc entre elles après une protéolyse de l'anticorps, dans certaines conditions. [1]

Ainsi nous comprenons que la structure même d'un anticorps, et plus particulièrement d'une IgG, est essentielle pour assurer sa fonction de reconnaissance spécifique et sa capture par les cellules immunitaires. En particulier, l'intégrité de la région Fab est capitale pour que l'anticorps puisse reconnaître sa cible. La dénaturation de cette région peut être provoquée par des changements de température, de force ionique, de pH, de contrainte mécanique, d'interaction avec une surface. De même, la disponibilité de la région Fab pour la capture est primordiale pour assurer la reconnaissance de l'antigène. Aussi, l'orientation de l'anticorps sur la surface est le premier critère essentiel à vérifier quand un anticorps y est immobilisé.

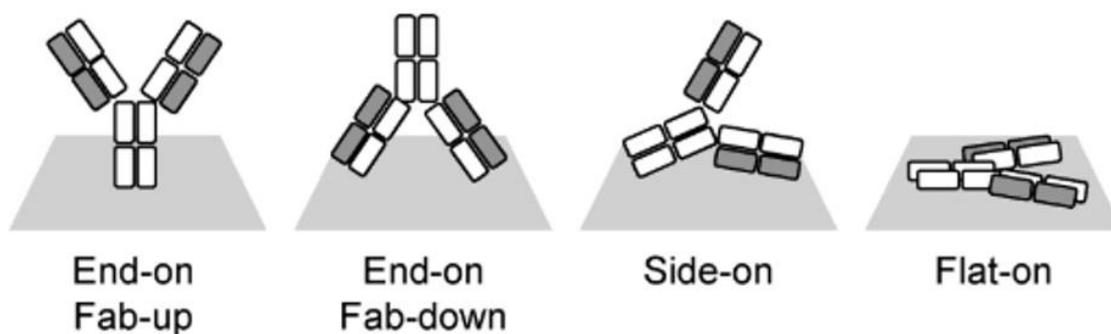


Figure 3 - 2. Orientation des anticorps sur une surface (adapté de [2])

En effet, en fonction de la nature de la surface (charge, encombrement), l'anticorps peut se fixer de différentes manières : avec les fragments Fabs libres et Fc immobilisé (« End-on Fab-up »), avec le fragment Fc libre et les Fabs immobilisés (« End-on Fab-down »), avec un fragment Fab libre et un fragment Fab et un fragment Fc immobilisés (« Side-on ») ou tous les fragments immobilisés sur la surface (« Flat-on ») (voir **Figure 3 - 2**).

La conformation « End-on Fab-up » avec les fragments Fab entièrement disponibles est l'orientation la plus favorable pour une reconnaissance et capture optimale de l'antigène. Ainsi, en fonction de la proportion de fragments libres et la nature de ces fragments, il est possible d'évaluer la bioréactivité d'un anticorps immobilisé.

Par ailleurs, le nombre d'anticorps immobilisés sur une surface donnée est également un critère capital pour évaluer la capacité d'une surface biofonctionnalisée à capturer un antigène. Plus il y a d'anticorps immobilisés (jusqu'à une certaine mesure¹), plus il y aura d'antigènes capturés, à condition que les anticorps soient bien orientés.

Aussi, pour résumer, le nombre d'anticorps sur une surface et la disponibilité de leur site de reconnaissance (Fab) sont les deux éléments essentiels pour qualifier la bioréactivité d'une surface, et dans notre cas, d'une bille. Plus une bille sera capable d'immobiliser des anticorps avec la bonne orientation, meilleure sera sa capacité de capture.

1.2.2. Méthodes existantes pour déterminer la bioréactivité des billes

Nous avons vu dans le chapitre 1 que l'utilisation des billes magnétiques comme supports pour la manipulation d'éléments biologiques en chimie analytique mais aussi dans les laboratoires sur puces a considérablement amélioré les performances d'analyses. Depuis, plusieurs études se sont intéressées à la question de la densité de recouvrement des anticorps sur la surface des billes. Avant même l'utilisation des billes, la question du recouvrement et de l'orientation des anticorps sur une surface était déjà une problématique au cœur de la performance des biocapteurs. Trilling *et al* [3] ont notamment publié une mini-revue sur le sujet, présentant différentes techniques physiques permettant d'élucider le nombre d'anticorps sur une surface ainsi que des éléments sur leur orientation. Différentes stratégies d'immobilisation des anticorps sur une surface sont également

¹ En effet, une trop grande densité en anticorps sur une surface donnée pourrait résulter d'une agrégation des molécules entre elles ou un entrelacement des chaînes protéiques pouvant entraîner une dégradation de la capacité de capture des anticorps par l'encombrement de la surface.

abordées, distinguant les méthodes non-orientées des méthodes orientées. Plus récemment, Welch *et al* [4] se sont également intéressés à la question, complétant avec d'autres techniques physiques de caractérisation (XPS, QCM, SPR) ainsi que des stratégies d'immobilisation covalente et non-covalente. Ces techniques que nous allons présenter sont pour la plupart transposables à l'étude des billes magnétiques fonctionnalisées.

1.2.2.1. L'étude de la densité d'anticorps en surface

Il est possible de distinguer les différentes méthodes utilisées selon qu'elles reposent sur une mesure physique d'une caractéristique de l'échantillon (masse, taille, réflexion optique, diffraction, topologie...) ou biochimique (structure, affinité, ...)

Les techniques physiques

- Microscopie à force atomique (AFM) : les mesures topologiques réalisées sur la surface permettent d'obtenir des informations sur l'épaisseur des couches, la conformation des protéines et leur répartition sur la surface (rugosité). Ces mesures présentent l'inconvénient d'être généralement faites sur surface sèche, et non à l'état natif des protéines [4].
- Analyse de suivi de nanoparticules (NTA) : cette technique permet de suivre l'évolution du rayon hydrodynamique des nanoparticules en solution en fonction des conditions de greffages. Elle mesure le mouvement brownien des particules dans un liquide illuminé par un laser et se rapproche de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) mais permet un suivi individuel des particules, tandis que la DLS effectue une mesure d'ensemble. Ruiz *et al* [5] ont ainsi mesuré la variation du rayon hydrodynamique de particules d'or en fonction de la concentration en anticorps. Cette technique peut être appliquée *in situ*. Cependant, le rayon hydrodynamique des particules ne peut pas toujours être précisément relié aux nombres de molécules immobilisées sur la bille. Des approximations et des modèles doivent alors être utilisés [6].
- Interférométrie par double polarisation (DPI) : cette technique utilise un guide d'onde optique et un laser pour sonder les couches moléculaires d'une surface. Elle permet d'obtenir des informations sur les dimensions des couches et leur arrangement en fonction des changements de propagation de l'onde évanescente produite dans l'échantillon par rapport à une référence. Elle offre une mesure en temps réel de la dynamique d'adsorption avec une mesure simultanée de la quantité, l'épaisseur, la densité et l'indice de réfraction des couches analysées. Cependant, elle nécessite des hypothèses sur la taille des molécules déposées, préalablement mesurées par d'autres techniques (diffraction des rayons X par exemple) ou obtenues *via* des modèles théoriques. Song *et al* [7,8] ont ainsi évalué le recouvrement d'anticorps sur une surface par DPI et comparé deux stratégies d'immobilisation, orientée et non-orientée. Par hypothèse sur la taille des molécules déposées, ils ont pu déterminer la densité d'anticorps en surface et en déduire l'orientation.
- Réflectométrie neutronique (NR) : un rayon de neutron est dirigé vers la surface et la mesure de l'intensité réfléchie en fonction de l'angle ou de la longueur d'onde permet d'obtenir des informations sur les épaisseurs et la conformation des couches moléculaires en surface. Zhang *et al* [9] ont ainsi pu étudier le comportement d'anticorps monoclonaux

à l'interface d'une surface de polymère en présence d'un tensioactif. Des hypothèses sur la taille des anticorps et des modèles théoriques sur la réflectivité des couches à sonder sont néanmoins nécessaires.

- Ellipsométrie spectroscopique (SE) : un faisceau lumineux polarisé est réfléchi sur la surface et est comparé à un modèle théorique de l'empilement des couches analysées. Il est ainsi possible d'en déduire l'épaisseur des couches et la quantité de matière déposée sur la surface. Zhao *et al* [10] ont ainsi utilisé une combinaison des 3 techniques précédentes (DPI, NR et SE) pour étudier l'adsorption d'anticorps monoclonaux à l'interface d'une surface de silice dans l'eau. L'ellipsométrie a ainsi permis de déterminer la quantité de molécules adsorbées, tandis que la réflectométrie des neutrons a permis de déterminer la structure des couches et leur densité avant d'être comparées aux mesures DPI. Cependant, ces 3 techniques nécessitent des modèles théoriques pour chaque couche, ainsi que des hypothèses sur la taille des molécules, en considérant un comportement global de la couche d'anticorps en surface.
- Résonance des plasmons de surface (SPR) : un faisceau laser monochromatique est envoyé sur une surface (d'or généralement) afin de générer des plasmons de surface (voir Chapitre 1). Ces plasmons sont alors absorbés différemment selon la nature de la surface. Le faisceau réfléchi est alors mesuré en intensité et en angle, et comparé à une surface de référence. Il est alors possible d'en déduire la quantité d'éléments sur la surface. C'est une des techniques les plus utilisées sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées [11].
- Spectroscopie photoélectronique X (XPS) : un faisceau de rayons X est envoyé vers la surface afin d'en analyser la composition élémentaire sur quelques nanomètres à partir des photoélectrons émis par interaction avec le faisceau incident. En mesurant la teneur en azote ou d'autres éléments typiques des protéines (comme le soufre), il est possible de déterminer la quantité d'anticorps sur la surface. Cependant, la détermination de l'orientation demande d'autres techniques complémentaires. Par ailleurs, les conditions d'observation nécessitent un vide élevé (ultra-vide), causant la dénaturation des protéines.
- Microbalance à cristaux de quartz (QCM) : un cristal de quartz piézoélectrique est mis en résonance et les changements dans la fréquence de résonance du cristal fournissent des informations sur la quantité de molécules immobilisées sur la surface. C'est une technique de mesure de changement de masse très précise mais non spécifique, et les informations sur l'orientation ne sont déduites que de manière indirecte par capture d'un antigène et comparaison avec la surface libre [2,12].
- La spectrométrie de masse des ions secondaires avec analyseur à temps de vol (ToF-SIMS) : cette technique repose sur le bombardement de la surface avec des atomes métalliques ionisés ou des clusters d'atomes afin de fragmenter des éléments de la surface pour analyser leur proportion et leur composition. La nature des acides aminés des différentes régions de l'anticorps permet de supposer l'origine du fragment analysé et donc la probabilité de l'orientation de l'anticorps sur la surface (un acide aminé donné sera par exemple plus abondant dans le fragment Fab, et sa présence dans l'analyseur supposera que le fragment

Fab est celui orienté vers l'extérieur de la surface). Tout comme l'XPS, cette technique nécessite de travailler dans des conditions ultra-vides ; ce qui a pour conséquence de dénaturer les protéines.

Harrison *et al* [13] ont ainsi utilisé une combinaison des 3 techniques précédentes afin de caractériser la densité et l'orientation de protéines G immobilisées sur une surface plane et des nanoparticules d'or. L'XPS a ainsi permis d'évaluer la quantité de protéines sur la surface, sans spécificité, tandis que le ToF-SIMS a permis d'identifier les protéines et leur orientation. Enfin, la QCM a permis d'évaluer les changements de quantité de matière immobilisés sur la surface au cours du temps ainsi que les propriétés visco-élastiques des couches de protéines immobilisées.

Bien que ces différentes méthodes offrent d'importantes informations sur le recouvrement des anticorps sur la surface et leur nombre, les informations d'orientation sont beaucoup moins fiables et reposent généralement sur 3 approches :

- Soit la surface est supposée uniforme avec une immobilisation homogène des anticorps dans une orientation donnée, et connaissant la taille de l'anticorps dans cette orientation, l'orientation globale de l'échantillon est déduite
- Soit un échantillon est fonctionnalisé avec un intermédiaire pour une immobilisation orientée en supposant qu'il favorisera exclusivement un type d'orientation (ex : Protéine A ou G, ou modification de la structure de la protéine) et est comparé à l'échantillon non orientée.
- Soit une étape de capture d'antigène ou de reconnaissance avec d'autres anticorps de taille/masse connue est ajoutée et la différence de taille/masse est comparée à l'échantillon initial pour en déduire le nombre d'anticorps à l'orientation favorable, capables de capturer un antigène.

De plus, la plupart des techniques ne sont pas applicables *in situ*, et particulièrement en solution, dans la conformation naturelle des anticorps lorsqu'ils sont utilisés pour les immunodosages. Enfin, les équipements utilisés sont rarement disponibles dans un laboratoire de biochimie où l'utilisation des billes magnétiques fonctionnalisées est la plus probable. Bien souvent, il faudra coupler différentes techniques pour assurer une caractérisation suffisamment fidèle de l'échantillon [14,15].

Les techniques physico-chimiques

Une autre catégorie de méthodes se base sur des principes physico-chimiques et des méthodes analytiques plus courantes dans les laboratoires de biochimie.

La quantification totale de la quantité de protéine à l'aide de tests colorimétriques comme les tests de Lowry, Bradford ou BCA est couramment utilisée mais reste une approche indirecte limitée en précision et spécificité [6]. De plus, des interférences peuvent survenir avec les nanoparticules [16].

Ainsi, Lammerhöfer *et al* [6] ont développé une méthode analytique par LC-FLD (chromatographie liquide avec détection fluorescente) pour quantifier des protéines immobilisées sur la surface de particules d'or (voir **Figure 3 - 3**).

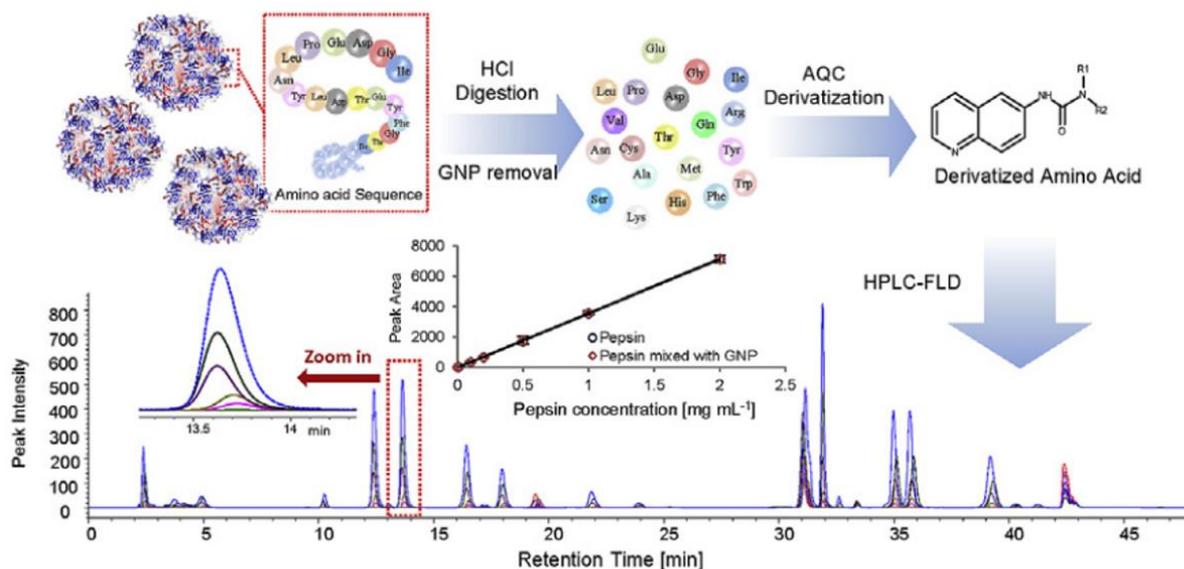


Figure 3 - 3. Principe de la méthode de quantification des protéines en surface de nanoparticules d'or par hydrolyse acide et dérivation des acides aminés pour analyse chromatographique (adapté de [6])

Les protéines immobilisées sur les nanoparticules sont d'abord hydrolysées par une solution de HCl, filtrés et centrifugés pour retirer les nanoparticules dissociées. Les acides aminés des protéines en solution sont ensuite dérivés avec du 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), un marqueur fluorescent des amines primaires et secondaires des protéines permettant le suivi par chromatographie couplée à une détection par fluorescence. A partir de la courbe de calibration réalisée sur certains acides aminés ou l'enzyme digérée, ils ont pu déterminer la concentration d'enzymes en surface des nanoparticules. Cette méthode est applicable *in situ* mais ne peut s'appliquer qu'à des échantillons ne présentant pas d'autres protéines que celle à quantifier ; autrement l'analyse serait alors faussée car elle ne ferait pas de distinction quant à l'origine de la protéine (enzymes, anticorps, protéines recombinantes...).

Ils ont par la suite réutilisé cette méthode pour l'analyse des particules d'or recouverte de protéine A et protéine G [17], démontrant la versatilité de leur méthode, bien que applicable à une catégorie de particules magnétiques qui ne présentent qu'un seul type de protéine. Il serait ainsi impossible de quantifier des anticorps capturés sur une bille protéine G par exemple, car les deux sources de protéines seraient indissociables après l'hydrolyse acide.

Alternativement, Gagey-Eilstein *et al* [18] ont développé un test chimiluminescent sur des billes magnétiques Streptavidine pour déterminer le taux de greffage de différentes biomolécules de différentes tailles, dont des anticorps (voir **Figure 3 - 4**).

Pour cela, différentes molécules couplées à la biotine ont été immobilisées sur des billes couplées à la streptavidine. Les sites de greffages inoccupés sur les billes sont ensuite conjugués à de la biotine couplée à la HRP et détectés par chimiluminescence dans un test à base de luminol. Le signal obtenu est alors comparé au signal d'une bille sans molécule greffée (i.e. 100% de ses sites disponibles). Il est ainsi possible d'en déduire de manière indirecte la capacité de greffage d'une population de billes pour différentes biomolécules en fonction de leur taille et de leur encombrement.

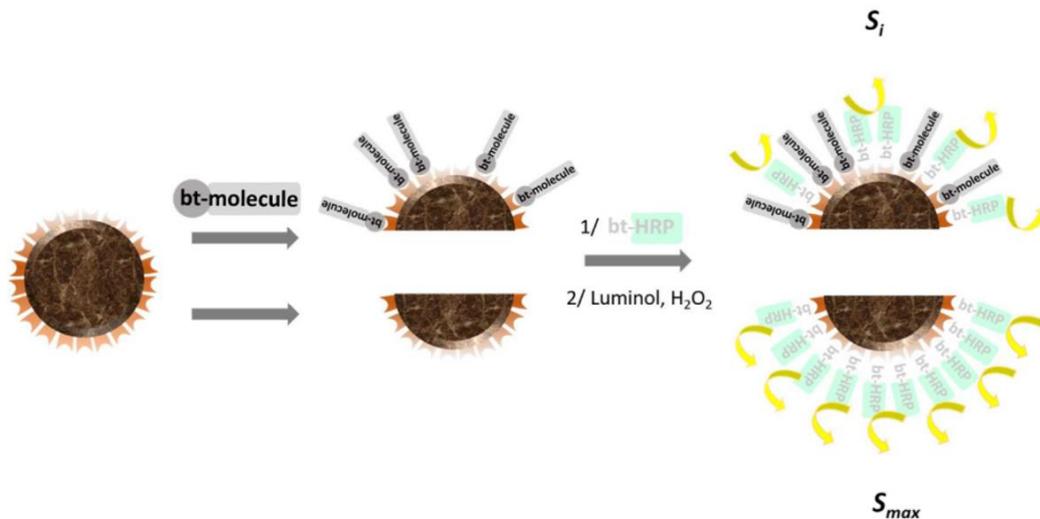


Figure 3 - 4. Principe de la détermination par chimiluminescence du recouvrement de billes Streptavidine par des biomolécules biotinylés, S_i étant le signal obtenu pour les billes greffées comparé à S_{max} le signal pour les billes non greffées (adapté de [18])

Enfin, Boujday *et al* [19] se sont intéressés au recouvrement de particules d'or par des IgG de lapin. Pour cela, les auteurs ont développé une méthode de quantification directe par spectrométrie de fluorescence. Les IgG sont d'abord marquées au FITC puis conjuguées aux particules par physisorption ou chimisorption. Les mesures directes sur particules ont mis en évidence un phénomène de *quenching* de l'intensité fluorescente du fait de l'accumulation des anticorps fluorescents sur un objet de très petite taille. Pour contourner ce phénomène, les particules d'or ont été alors dissoutes par une solution de NaCN afin de libérer les anticorps fluorescents immobilisés dans la solution. La concentration en anticorps a ensuite été quantifiée par spectrofluorimétrie à partir de courbes de calibration sur des échantillons standards. Peu de différences dans la quantité d'anticorps par particules ont été notées entre la physisorption et la chimisorption des anticorps.

Les résultats de quantification ont enfin été comparés à deux méthodes de dosages indirectes par spectrofluorimétrie et test ELISA sur les solutions de rinçages et surnageant de greffages des particules. Des écarts de quantification ont ainsi été mis en évidence avec une surestimation du recouvrement des particules par les méthodes indirectes.

Ces différents travaux ont porté sur un type de particules précis (particules d'or ou billes magnétique streptavidine) avec la difficulté pour certaines approches d'étudier des particules contenant plusieurs sources protéiques. Par ailleurs, aucune de ces méthodes ne permet d'obtenir des informations sur l'orientation des anticorps sur la surface des particules. En réalité, très peu d'études ont réussi à répondre à ces deux problématiques comme nous allons le voir dans la section suivante.

1.2.2.2. Etude de l'orientation des anticorps

Comme expliqué précédemment, les études d'orientation des anticorps sur les surfaces sont généralement effectuées par l'intermédiaire d'espèces spécifiques dont la reconnaissance sera dépendante de l'orientation. Nous retrouvons notamment l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les fragments Fc ou Fab des anticorps déjà immobilisés [12,20], ou encore l'ajout

contrôlé d'antigène, mais ces méthodes ne sont pas à l'abri des faux positifs et de l'adsorption non spécifique [21,22].

Une étude récemment publiée par Shen *et al* [23] utilise une approche enzymatique, similaire à celle que nous avons développée dans ce chapitre de thèse. Dans leur approche, Shen *et al* utilise une digestion enzymatique des anticorps greffés sur des billes magnétiques par d'autres billes magnétiques recouvertes de trypsine. Les fragments digérés sont ensuite analysés par LC-MS/MS afin de quantifier les peptides représentatifs des fragments Fab ou Fc. Cela leur permet ensuite d'estimer la proportion d'anticorps greffés *via* les fragments F(ab)₂ versus Fc.

La trypsine est une enzyme qui coupe les anticorps en plusieurs points ; ce qui donne 11 peptides après digestion d'un anticorps par la trypsine. Il est alors difficile de déterminer si les peptides représentatifs des fragments Fab sont issus d'un anticorps immobilisé par son fragment Fc ou par un des fragment Fab (non digéré), comme c'est le cas des IgG « side-on » sur la **Figure 3 - 2**. Ceci peut conduire à une surestimation des anticorps bien orientés. Par ailleurs, les auteurs supposent que l'utilisation de trypsine immobilisées sur des billes magnétiques permet de restreindre la zone de digestion de la trypsine sur les billes recouvertes d'anticorps à la couche extérieure d'anticorps sur la bille. Les trypsines immobilisées seraient moins mobiles et donc leur taux de digestion diminuerait, mais cela reste à démontrer.

Enfin, les informations sur l'orientation sont obtenues au détriment des informations sur la densité d'anticorps en surface car l'étude utilise un test BCA pour la quantification. Cela diminue la précision de la mesure, en particulier sur des billes Protéine G où la quantification de la quantité totale de protéine ne permet pas de déterminer si le signal provient de la Protéine G ou anticorps. Néanmoins, il s'agit d'une des premières études s'intéressant à l'orientation des anticorps sur les billes magnétiques en utilisant une approche enzymatique couplée à une analyse chromatographique.

Face à ce manque de méthodes universelles et fiables pouvant caractériser à la fois le recouvrement et l'orientation des anticorps sur une variété de particules magnétiques, nous avons entrepris de développer une méthode analytique afin de comparer la bioréactivité de plusieurs billes commerciales.

2. Développement d'une méthode de caractérisation de la bioréactivité des billes magnétiques

2.1. Digestion enzymatique des anticorps

Afin de proposer une méthode de détermination fiable de l'orientation des anticorps sur une surface, nous avons développé un protocole enzymatique se basant sur la haute spécificité d'une enzyme pour la digestion des IgG. Cette enzyme dénommée *IdaS* est une endopeptidase de 35 kDa capable de couper précisément en un site de l'IgG, sur les chaînes lourdes, juste sous la région charnière (voir **Figure 3 - 5**). Ainsi, les fragments obtenus après digestion d'une IgG par l'*IdaS* sont : un fragment F(ab)₂ (les deux fragments Fab sont encore reliés par la charnière) et un fragment Fc, les deux chaînes étant maintenues par la glycosylation [1] (bien que parfois deux Fc/2 puissent être obtenus en fonction des conditions d'analyse [24]).

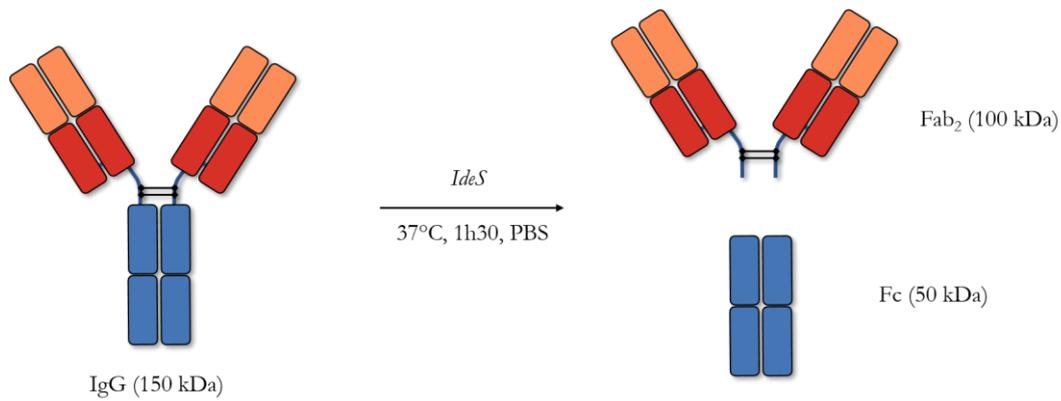


Figure 3 - 5. Schéma de la digestion des IgG par l'*IdeS*

Dans le cas d'une IgG liée à une surface par l'un de ses fragments, seul le fragment libre sera libéré après digestion. Aussi, dans le cas d'une bille magnétique, lorsqu'un champ magnétique sera appliqué, la surface de la bille conservera le fragment immobilisé tandis que le fragment libéré en solution sera aisément recueilli comme illustré par la **Figure 3 - 6**.

Le fragment ainsi collecté dans le surnageant après digestion par l'*IdeS* de la bille fonctionnalisée permettra de déterminer l'orientation de l'anticorps sur la bille. Si l'anticorps est immobilisé par un des fragments Fab ou les deux, le fragment Fc sera libéré dans le surnageant par la digestion. À l'inverse, si l'anticorps est immobilisé par son fragment Fc, le fragment F(ab)₂ sera libéré dans le surnageant. De plus, ces fragments ont des masses moléculaires bien distinctes : 50 kDa pour le fragment Fc et 100 kDa pour le fragment F(ab)₂. En utilisant une méthode séparative capable de séparer des molécules selon leur taille, il est alors possible de quantifier la proportion de fragments de chaque type dans un échantillon donné. C'est donc exactement la stratégie que nous avons adoptée avec l'utilisation de la chromatographie par exclusion stérique (SEC).

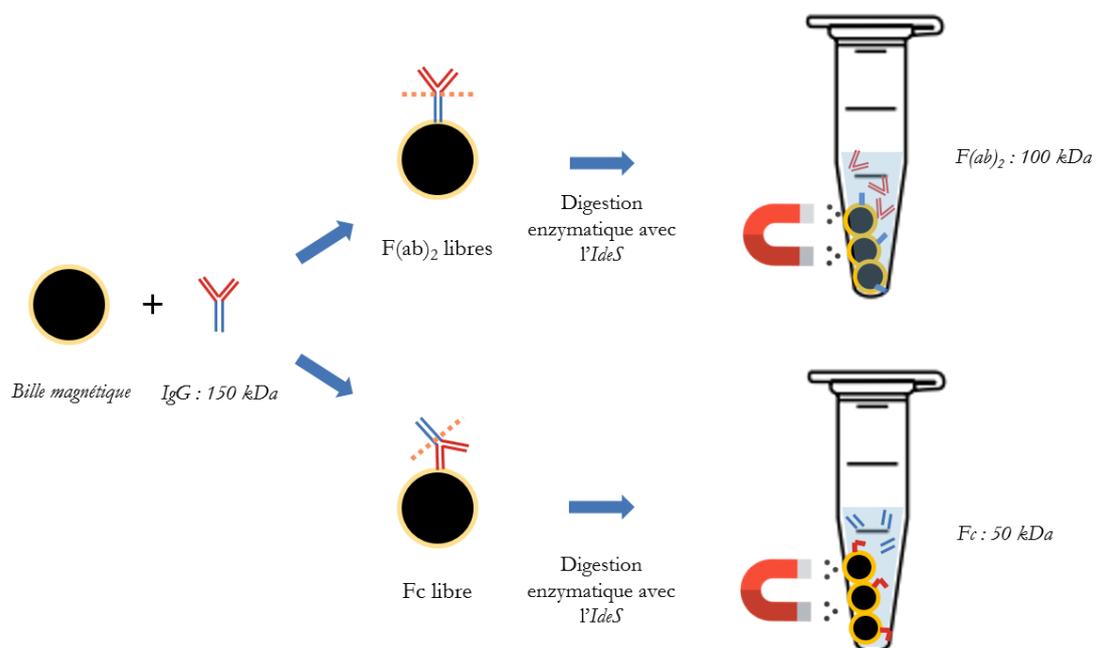


Figure 3 - 6. Principe de la digestion par l'*IdeS* de billes magnétiques greffées par des IgG

2.2. Greffage des anticorps sur les billes

Pour notre étude, nous avons sélectionné les quatre types de billes magnétiques les plus couramment utilisées pour l'immobilisation d'anticorps : les billes Dynabeads MyOne COOH, Ts et Streptavidin et les billes Pierce Protein G. Les billes sont greffées avec des IgG humaines modèles à une concentration de 0.1 mg/mL. Les protocoles de greffage varient d'un type de billes à l'autre et certains protocoles ont été adaptés à partir des précédents travaux de l'équipe Protéines et Nanotechnologies en Sciences Analytiques (PNAS, Institut Galien Paris Sud) sur ce type de billes (COOH et Ts). Les protocoles utilisés sont décrits en annexe.

Une fois les billes greffées, un protocole d'analyse par SEC-FLD des fragments d'anticorps après digestion enzymatique des billes a été développé.

2.3. Analyse par SEC-FLD des fragments d'anticorps

Pour l'analyse des IgG en solution et digérées sur les billes, nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion stérique avec détection fluorescente (SEC-FLD) dont le principe d'analyse en conditions non dénaturantes est décrit en annexes.

Pour cela, nous avons utilisé une colonne Agilent Bio SEC-3, de taille de particules de 3 μm , des pores de 300 \AA , de 300 mm de long et 4.6mm de diamètre interne. Le détecteur utilisé est un détecteur à fluorescence (FLD) Agilent 1260 UHPLC-1260 avec une lampe au Xénon. La colonne est maintenue à une température de 25°C. La phase mobile consiste en 50 mM de phosphate de sodium, 150mM NaCl et 10% d'isopropanol à un pH de 6.5. Elle est alimentée par pompage isocratique à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. La détection FLD est effectuée à 280 nm d'excitation et 340 nm d'émission. Ces longueurs d'onde sont choisies pour la détection de la fluorescence intrinsèque des protéines *via* les acides aminés aromatiques : le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine. L'acquisition de données et le contrôle de l'instrumentation sont effectués sur le logiciel Chemstation d'Agilent.

2.3.1. Validation de la méthode

La méthode d'analyse a été développée tout d'abord pour quantifier les IgG humaines (hIgG) en solution en conditions non dénaturantes. Après l'analyse d'une solution d'hIgG à 0.1 mg/mL le chromatogramme obtenu est présenté sur la **Figure 3 - 7**.

Nous observons deux pics : le premier à 8.2 min. correspond à la forme dimérique de l'IgG (~300 kDa) ; le second pic à 9.2 min. correspond à la forme monomérique de l'IgG (~150 kDa). L'aire relative du premier pic étant très faible devant celle du second pic (rapport relatif de ~8), la forme dimérique a alors été négligée dans les calibrations de la méthode.

La répétabilité et la précision intermédiaire des temps de rétention de la méthode ont été évaluées. Pour cela, deux injections consécutives de 3 réplicas d'échantillons d'hIgG à 0.1 mg/mL dans le PBS ont été effectuées le même jour et avec la même colonne. La variation relative standard (RSD) intra-jour obtenue est de <0.1% et 0.7% respectivement pour les temps de rétention et l'aire des pics. La précision intermédiaire a été évaluée en injectant 3 échantillons d'hIgG deux fois par jour pendant deux jours. Les RSD inter-jour sur les temps de rétention et les aires des pics ont alors été évaluées à moins de 0.1% dans les deux cas. Enfin, la limite de quantification a été calculée en injectant un échantillon d'IgG à 160 nM dans le PBS afin d'obtenir un chromatogramme avec un rapport signal-sur-bruit de 10.

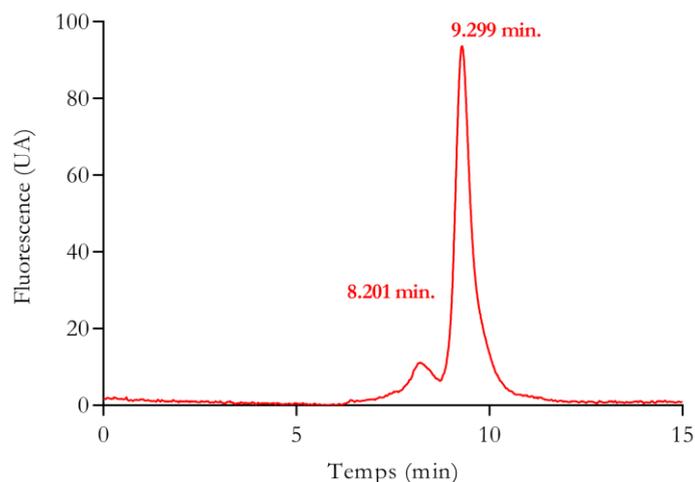


Figure 3 - 7. Chromatogramme de l'analyse par SEC-FLD d'une solution d'IgG humaine à 0.1 mg/mL. Phase mobile 50mM phosphate de sodium, 150 mM NaCl et 10% isopropanol pH 6.5. Colonne BioSEC-3 (4.6 mm x 300 mm, 300 Å, diamètre particule 3 μ m) ; débit 300 μ L/min ; FLD λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm.

Pour la suite des expériences et la quantification des échantillons d'hIgG et de fragments d'hIgG digérée, il est nécessaire de construire des courbes de calibration à partir de quantités connues d'anticorps entiers et digérés. Cependant, nous avons souhaité d'abord vérifier si le signal fluorescent d'une espèce donnée pouvait être altéré par le milieu dans lequel il se trouvait et les éventuels traitements subis avant analyse.

2.3.2. Etude de l'influence des conditions de greffage des billes sur le signal FLD

Les différents protocoles de greffage qui ont été développés pour les billes étudiées sont présentés dans les annexes correspondant à la partie 2.2 de ce chapitre. Chaque protocole utilise des conditions de greffage différentes en termes de temps et température d'incubation, agitation mécanique et solution tampon. Nous avons alors supposé que ces différentes conditions pourraient avoir un impact sur la conformation des anticorps et donc sur l'exposition des acides aminés fluorescents responsables du signal de détection mesuré par la méthode. Aussi, nous avons d'abord étudié l'impact des protocoles de greffage sur le signal d'une solution d'hIgG à 0.1 mg/mL en séparant les protocoles sur deux critères : tampon et agitation/température/temps, avec les protocoles des billes COOH et Ts étant les plus contraignants en termes de tampon et de conditions d'incubation.

2.3.2.1. Etude des conditions de greffage sur le signal fluorescent des hIgG entières

La solution d'hIgG à 0.1 mg/mL a donc été incubée dans du PBS selon les deux protocoles : d'une part sur un agitateur rotatif à 4°C pendant une nuit (protocole COOH) ; d'autre part à 37°C pendant 16h à 650 rpm (protocole Ts). Sur la **Figure 3 - 8**, nous observons dans le premier cas une légère diminution du signal FLD de 5.2% par rapport à la solution de référence conservée à 4°C sans agitation. Dans le second cas, nous observons une hausse de 9.6% du signal dans les conditions de billes Ts.

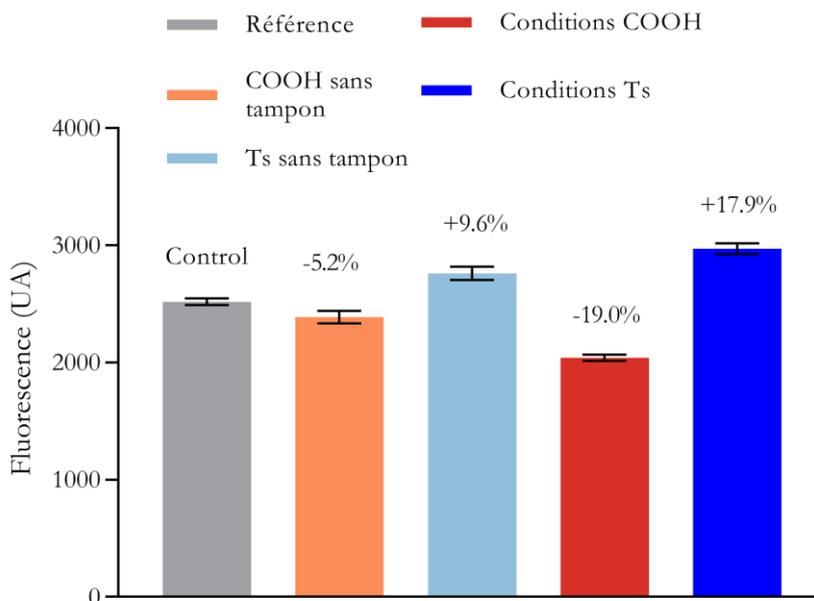


Figure 3 - 8. Influence des conditions de greffage sur le signal FLD d'une solution standard d'hIgG à 0.1 mg/mL

Enfin, en ajoutant à ces protocoles d'incubation les différents tampons (PBS pour les billes COOH et borate 0.1M / ammonium 3.0M pH 9.5 pour les billes Ts) et espèces supplémentaires éventuelles (EDC et S-NHS), le signal FLD diminue de 19% dans le cas du protocole COOH et augmente de 18% dans le cas du protocole Ts. De telles variations peuvent s'expliquer par l'altération de la conformation des anticorps dans les différentes conditions de greffage. Cette conformation est affectée par la température et l'agitation ainsi que le changement de pH (dans le protocole Ts) et de force ionique ou les réactions parasites des anticorps entre eux en présence d'EDC/S-NHS dans le protocole COOH. Ces altérations modifiant l'exposition des acides aminés fluorescents intrinsèques aux anticorps, le signal FLD en est sensiblement affecté.

Ainsi, la prise en compte des différents protocoles de greffage est nécessaire pour la calibration des courbes d'étalonnage pour assurer une quantification la plus précise possible des anticorps et des fragments par SEC-FLD. Cette même étude a alors été réitérée pour les fragments Fc et F(ab)₂ issus de la digestion des IgG humaines par l'*IdeS* et selon les différents protocoles et conditions de greffage des 4 types de billes étudiés.

2.3.2.2. Etude des conditions de greffage sur le signal fluorescent des fragments d'hIgG digérée

Comme expliqué dans la partie 2.1, la digestion des hIgG par l'*IdeS* conduit à l'obtention de deux fragments de tailles différentes, et donc deux pics : un premier pic à 9.9 min. correspondant au fragment F(ab)₂ et un second à 10.93 min. correspondant au fragment Fc (voir **Figure 3 - 9**). Pour toutes les étapes de digestion des expériences présentées, le protocole suivant a été appliqué : 2 µL d'un aliquot de 100 U d'*IdeS* FABRICATOR (Genovis) et 50 µL de tampon phosphate (100 mM, pH 7.0) sont ajoutés à 60 µL de solution d'hIgG en suspension ou d'hIgG greffées sur les billes magnétiques et incubés pendant 1h30 à 37°C et agité à 300 rpm sur un Thermomixer. Les billes (le cas échéant) sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et le surnageant est prélevé et analysé.

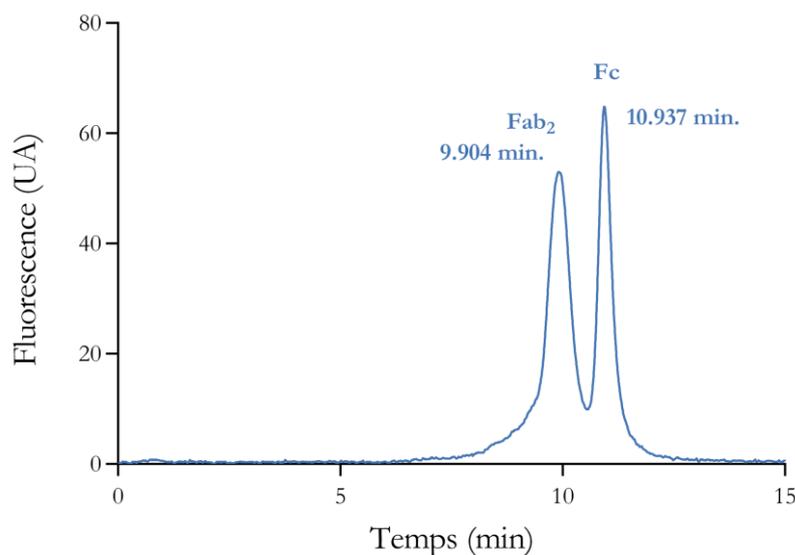


Figure 3 - 9. Chromatogramme de l'analyse par SEC-FLD d'un échantillon d'IgG à 0.22 mg/mL digéré par l'*IdeS* (100 U). Conditions d'analyse identique à la Figure 3 - 7.

L'identification des pics correspondant aux deux fragments a été confirmée par analyse SEC-FLD couplée à un spectromètre de masse selon le même protocole d'analyse mais dans un tampon dénaturant permettant l'analyse par spectrométrie de masse (bicarbonate d'ammonium). Pour cela, une solution d'IgG à 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a été digérée par l'*IdeS* et injectée dans la colonne couplée à la masse. Seul le fragment Fc de plus forte intensité a été détecté en masse, le pic du fragment F(ab)₂ n'a pas été détecté par l'analyseur. Une masse de 50 kDa a été obtenue, confirmant l'attribution du pic à 10.9 min au fragment Fc. L'autre pic sur le signal FLD a donc été attribué au fragment Fab₂ par déduction.

Pour la quantification des fragments d'anticorps par SEC-FLD, des courbes de calibration ont été construites en fonction des conditions de greffage des différentes billes. Les conditions de greffage des billes Protéine G et Streptavidine étant proches en termes de tampon et d'agitation/température, une même courbe de calibration a été utilisée pour les deux types de billes car peu de modifications du signal fluorescent étaient attendues entre les deux protocoles. Ainsi, une solution mère d'IgG a d'abord été digérée par l'*IdeS* puis séparée en 3 populations selon les 3 protocoles de greffage des billes (Ts, COOH et Protéine G/Streptavidine). Chaque solution a ensuite subi les différentes étapes des protocoles de greffage (tampon, agitation, température). L'analyse des fragments à différentes concentrations pour la construction des courbes de calibration montre d'importantes variations du signal fluorescent pour un même fragment en fonction des conditions de greffage (voir **Figure 3 - 10**). Plus particulièrement, la pente de la courbe de calibration pour le fragment Fc dans les conditions de greffage des billes COOH diminue de 25% par rapport aux billes Ts. Cela pourrait conduire à une erreur d'estimation de l'orientation des anticorps sur ces billes si cette influence des conditions de greffage n'est pas prise en compte. Ainsi, ces différentes courbes ont été utilisées par la suite pour estimer la quantité de fragments en solution dans le surnageant après digestion des billes greffées selon leur protocole respectif.

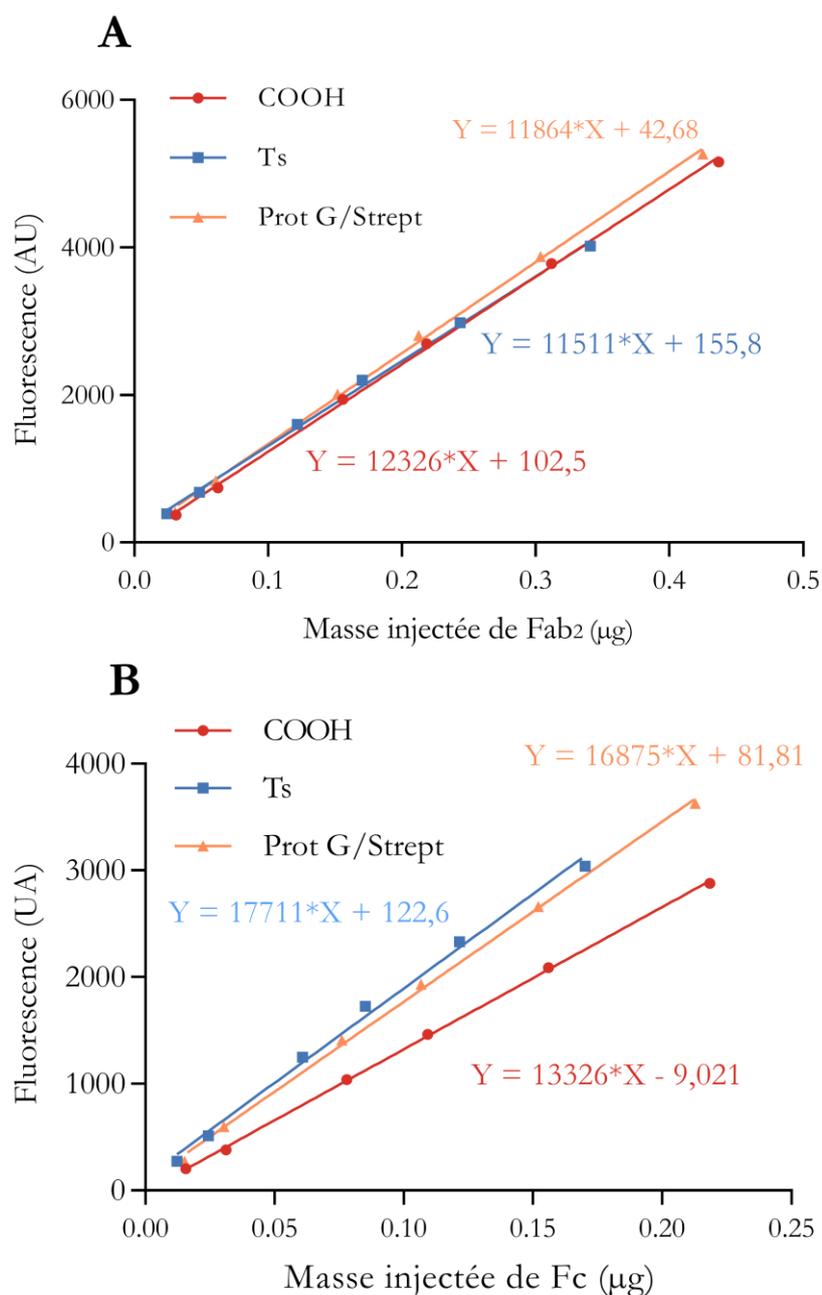


Figure 3 - 10. Courbes de calibration des fragments $F(ab)_2$ (A) et Fc (B) par analyse SEC-FLD selon les différentes conditions de greffage des billes magnétiques

Enfin, en dehors de la contribution des conditions de greffage sur le signal fluorescent des fragments d'anticorps, un autre élément présent dans les solutions analysées doit être pris en compte : l'*IdeS*.

2.3.3. Contribution du signal de l'*IdeS* à la détection FLD

Une molécule d'*IdeS* possède une taille de 37 kDa, proche des tailles des fragments d'anticorps digérés. Aussi, il est possible que l'analyse par SEC-FLD d'échantillons digérés par l'*IdeS* montre une superposition des pics de tailles voisines. Afin de s'en assurer, nous avons analysé un

échantillon d'*IdeS* (5 U) seul par SEC-FLD (voir **Figure 3 - 11**). Nous observons alors 2 pics à 10.08 min. et 11.00 min. Ces pics aux temps de rétention très proches des pics des fragments F(ab)₂ et Fc correspondent respectivement au dimère de l'*IdeS* (~75 kDa) et au monomère (~37 kDa). Sur un chromatogramme d'hIgG digéré, ces pics sont bien confondus avec les pics des fragments d'hIgG comme le montre la **Figure 3 - 9**. Ils contribuent donc au signal fluorescent d'un échantillon d'hIgG digéré et peuvent mener à une surestimation de la quantité de fragments dans l'échantillon si leur contribution n'est pas prise en compte. C'est particulièrement le cas pour le fragment Fc où la contribution du monomère d'*IdeS* est la plus importante.

Aussi, une courbe de calibration pour le monomère et le dimère d'*IdeS* ont été construites en injectant différents volumes d'une même solution d'*IdeS* afin de correspondre aux nombres d'unités enzymatiques utilisées dans les échantillons d'anticorps digérés (de 1 U à 14 U). L'*IdeS* a également été mis en présence des billes pour la construction des courbes de calibration afin de prendre en compte un éventuel effet des billes sur le signal FLD des solutions d'*IdeS*. Ces courbes sont représentées sur la **Figure 3 - 12**. Par la suite, les aires de pics des fragments F(ab)₂ et Fc ont été systématiquement corrigées en soustrayant la contribution de l'*IdeS* dans le signal obtenu. L'ensemble des corrections effectuées est résumé dans **Tableau 3 - 2**.

Il est intéressant de noter sur la **Figure 3 - 12** que des variations de la pente des courbes de calibration de l'*IdeS* surviennent en présence des billes. En effet, pour certaines billes comme les billes Ts, la pente de la courbe varie sensiblement par rapport au contrôle (correspondant à une solution d'*IdeS* seul). Cela pourrait s'expliquer par une potentielle adsorption de l'*IdeS* sur la bille non greffée. La chimie de surface de chaque bille étant différente, comme résumé dans le **Tableau 3 - 1** de la partie 1, l'*IdeS* peut se comporter différemment en présence des billes. Aussi, il nous a paru important de prendre en compte ce paramètre lors de la correction en utilisant une courbe de calibration représentant le plus possible les conditions de digestion des anticorps en présence d'une bille magnétique donnée.

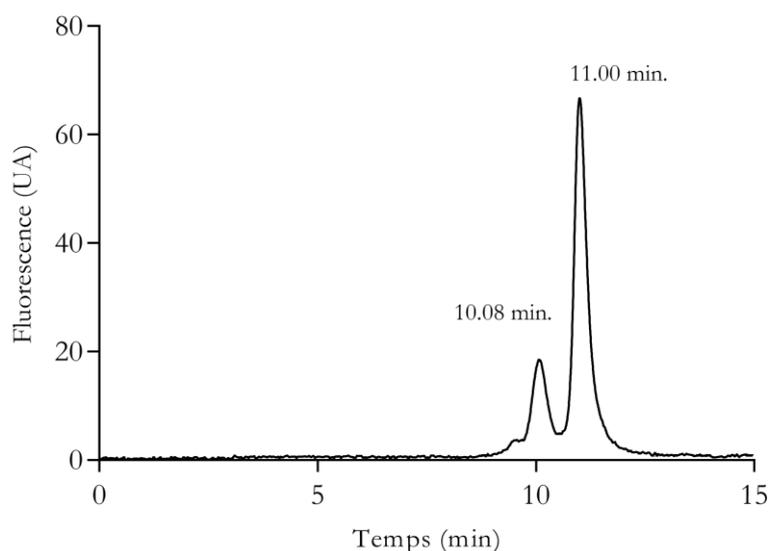


Figure 3 - 11. Analyse d'un échantillon d'*IdeS* (5 U) par SEC-FLD. Conditions d'analyse identique à la Figure 3 - 7.

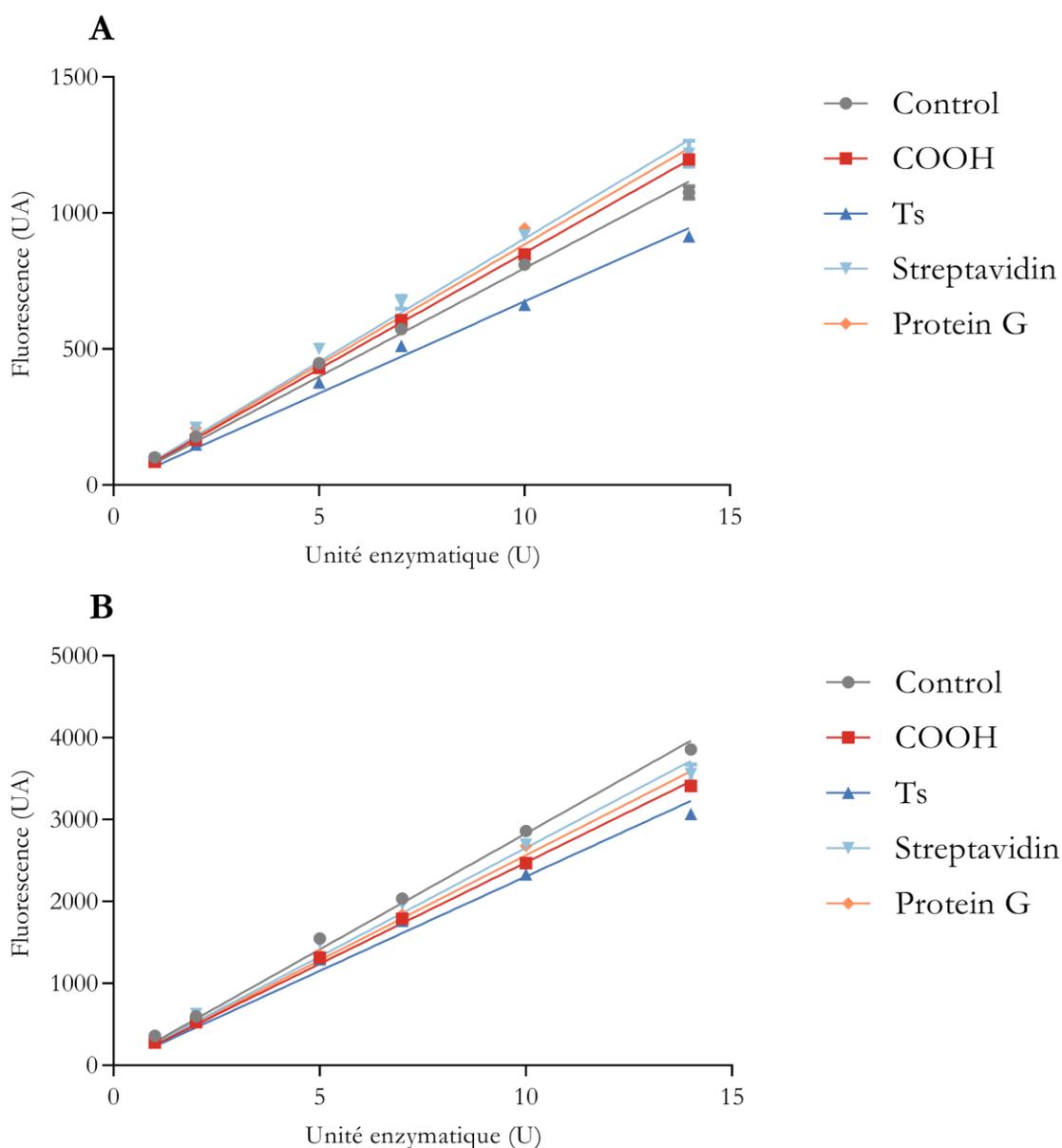


Figure 3 - 12. Courbes de calibration du dimère (A) et monomère (B) d'*IdeS* en solution (contrôle) par analyse SEC-FLD et en présence des différentes billes magnétiques.

Ainsi, par l'ensemble de calibration et correction présentées, nous avons développé une méthode d'analyse des hIgG greffées sur les billes magnétiques particulièrement complète et fidèle. A notre connaissance, c'est la première fois que le comportement d'une enzyme comme l'*IdeS* est étudié en présence de billes magnétiques, et qu'un protocole analytique intègre autant de vérifications et corrections pour une quantification des anticorps digérés la plus précise possible. Cette méthode a ainsi permis de caractériser et comparer les performances des billes commerciales, mais pourrait également être transposée à d'autres types de surface comprenant des anticorps greffés.

Tableau 3 - 2. Correction du signal FLD après calibration du monomère et dimère d'*IdeS* selon les différents types de billes et le volume d'injection des échantillons dans la colonne.

Types de billes	Concentration IdeS dans le digestat (U/ μ L)	Volume de digestat injecté dans la colonne (μ L)	Pente de la courbe de calibration du monomère d'IdeS (fluorescence u.a/unité enzymatique U)	Correction appliquée à l'aire du pic Fc (fluorescence u.a)	Pente de la courbe de calibration du dimère d'IdeS (fluorescence u.a/unité enzymatique U)	Correction appliquée à l'aire du pic F(ab) ₂ (fluorescence u.a)
Billes COOH	1,92	3,0	247,6	1428,34	85,33	492,26
Billes Ts		1,0	230,5	443,23	67,47	129,75
Billes Protéine G		1,0	256,4	493,0	88,42	170,04
Billes Streptavidine		3,0	265,4	1531,32	90,59	522,63

2.4. Caractérisation du greffage des anticorps sur les billes magnétiques

2.4.1. Estimation de la densité d'anticorps greffés sur les billes

Pour l'estimation de la quantité d'anticorps greffés sur chaque bille, nous avons procédé à une mesure indirecte à partir de la quantité d'hIgG restante dans le surnageant après greffage des billes et dans les solutions de rinçage des billes à l'issue de l'étape de greffage. Une quantification directe basée sur la quantité de fragments obtenus après digestion n'aurait pas pris en compte l'efficacité de la digestion des anticorps par l'*IdeS*, résultant probablement en une sous-estimation de la quantité d'anticorps sur la bille. Ce point est notamment abordé dans la partie 2.4.2.

En effet, une fois les billes greffées, la solution d'hIgG utilisée pour le greffage des billes est prélevée et conservée pour analyse. De même, les billes sont rincées plusieurs fois après le greffage pour éliminer les anticorps adsorbés sur la bille mais non greffés. Ces volumes de solution de rinçage étant importants, il a d'abord fallu préconcentrer les anticorps présents. Pour cela, les solutions de rinçage sont ultrafiltrées sur une membrane de 100 kDa. 500 μ L de solution de rinçage sont ajoutés au flacon de filtration et centrifugés pendant 4 minutes à 10 000 rpm à 4°C sur une centrifugeuse MicroStar 17R (VWR). Le processus est répété jusqu'à que toute la solution de rinçage soit filtrée. Les volumes de rétentats sont ensuite mesurés avant l'analyse par SEC-FLD.

Le pourcentage d'hIgG greffées sur les billes est évalué à l'aide de la formule suivante :

Équation 1

$$\%_{\text{greffées}} = \frac{m_i - (m_{\text{rinçage}} + m_{\text{surnageant}})}{m_i}$$

où m_i est la masse initiale d'hIgG par mg de billes avant greffage, $m_{\text{rinçage}}$ et $m_{\text{surnageant}}$ les masses d'hIgG retrouvées dans les solutions de rinçage ultrafiltrées et le surnageant après greffage des billes. Pour la quantification des quantités d'hIgG dans ces échantillons, une courbe de calibration d'hIgG en solution dans le PBS a été construite (voir **Figure 3 - 13**).

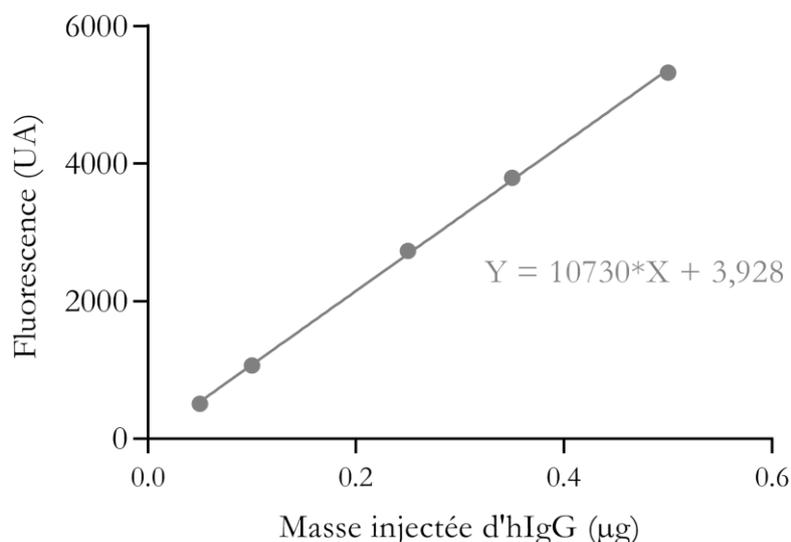


Figure 3 - 13. Courbe de calibration d'IgG humaine en solution dans le PBS à 0.1 mg/mL par analyse SEC-FLD.

Le nombre d'hIgG par bille a aussi été évalué en considérant la masse moyenne d'une hIgG (150 kDa), la densité des billes (voir **Tableau 3 - 1**) et le diamètre moyen des billes (1 µm), selon la formule suivante :

Équation 2

$$\text{Nombre de molécules d'hIgG par bille} = \frac{\%_{\text{greffé}} \times m_i}{m_{\text{IgG}}} \times \frac{m_{\text{bille}}}{1 \text{ mg de billes}}$$

où $\%_{\text{greffé}}$ est la proportion d'hIgG greffée sur la bille, m_i la masse initiale d'hIgG incubées avec 1 mg de billes lors du greffage, m_{IgG} la masse (µg) d'une molécule d'hIgG, m_{billes} la masse (µg) de la bille.

Nous avons donc évalué le pourcentage d'anticorps greffés pour les différentes billes par rapport à la quantité initiale d'anticorps utilisée pour le greffage ainsi que le nombre moyen d'hIgG par billes (voir **Figure 3 - 14**). Nous pouvons en conclure que les billes Protéine G présentent la meilleure efficacité de greffage avec 95.1% des anticorps greffés sur la bille par rapport à la quantité initiale d'anticorps contre 73.8% pour les billes COOH. Par ailleurs, le taux de greffage des billes Protéines G est nettement supérieur en nombre d'anticorps greffés par billes avec ~70 000 anticorps par bille contre ~12 000 pour les billes COOH, ~56 000 pour les billes Ts et ~25 000 pour les billes Streptavidine.

Les billes Protéine G semblent donc présenter des performances de greffage bien supérieures aux autres billes. Cependant, il reste néanmoins à vérifier l'orientation des anticorps sur chaque bille.

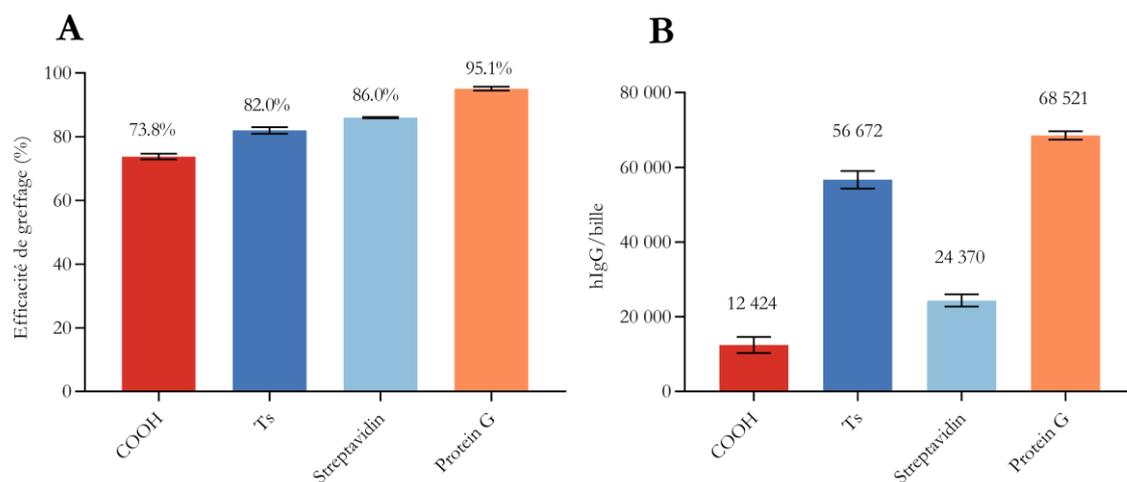


Figure 3 - 14. Efficacité de greffage d'hIgG sur les différentes billes : (A) pourcentage d'hIgG greffées sur les billes par rapport à la quantité initiale d'anticorps ; (B) nombre moyen de molécules d'hIgG par bille.

2.4.2. Evaluation de l'orientation des anticorps sur les différents types de billes magnétiques

Pour évaluer l'orientation des anticorps sur la surface de chaque bille, nous nous sommes intéressés aux fragments issus de la digestion des billes greffées par l'*IdeS*. En particulier, l'aire des pics des fragments $F(ab)_2$ et Fc, et plus particulièrement le rapport $F(ab)_2/Fc$ des aires de pics, nous a renseignés sur la proportion relative d'un fragment donné dans le digestat. La **Figure 3 - 15** montre les chromatogrammes obtenus après la digestion des différentes billes greffées. Nous remarquons que le ratio des intensités des pics varie en fonction des billes ; plus particulièrement le rapport s'inverse pour les billes Protéine G avec un pic $F(ab)_2$ plus intense que le pic Fc. Cela démontre que la bille Protéine G permet une meilleure orientation des anticorps sur sa surface en privilégiant une orientation « Fab up » confirmant l'affinité spécifique de la protéine pour la région Fc des hIgG [25].

Ainsi, pour chaque bille nous avons évalué le quotient d'orientation $F(ab)_2/(F(ab)_2 + Fc)$. Plus ce quotient est élevé, plus il y a de fragments $F(ab)_2$ en solution dans le digestat par rapport au Fc, et donc plus les anticorps sont greffés par leur fragment Fc, soit une orientation favorable pour la capture de l'antigène, comme expliqué dans la **Figure 3 - 6**. La **Figure 3 - 16** présente les quotients d'orientation calculés pour chaque bille avec une nette supériorité pour les billes Protéine G (73.8% des anticorps sont orientés avec le fragment $F(ab)_2$ libre), suivi des billes Ts (31.3%) puis Streptavidine (9.8%) et enfin COOH (5.2%).

Enfin, afin de s'assurer que l'efficacité apparente des billes Protéine G soutenue par un meilleur ratio Fab_2/Fc n'était pas due à une meilleure efficacité de la digestion enzymatique sur ces billes, nous avons estimé le rendement de digestion par l'*IdeS* pour chaque bille selon la formule suivante :

Équation 3

$$\%_{digéré} = \frac{m_{digérée}}{m_i - (m_{rinçage} + m_{surnageant})}$$

où m_i est la masse initiale d'hIgG par mg de billes pour le greffage, $m_{rinçage}$ et $m_{surnageant}$ les masses d'hIgG obtenues dans les liquides de rinçages des billes et le surnageant après greffage, $m_{digérée}$ la masse d'hIgG restante dans le digestat.

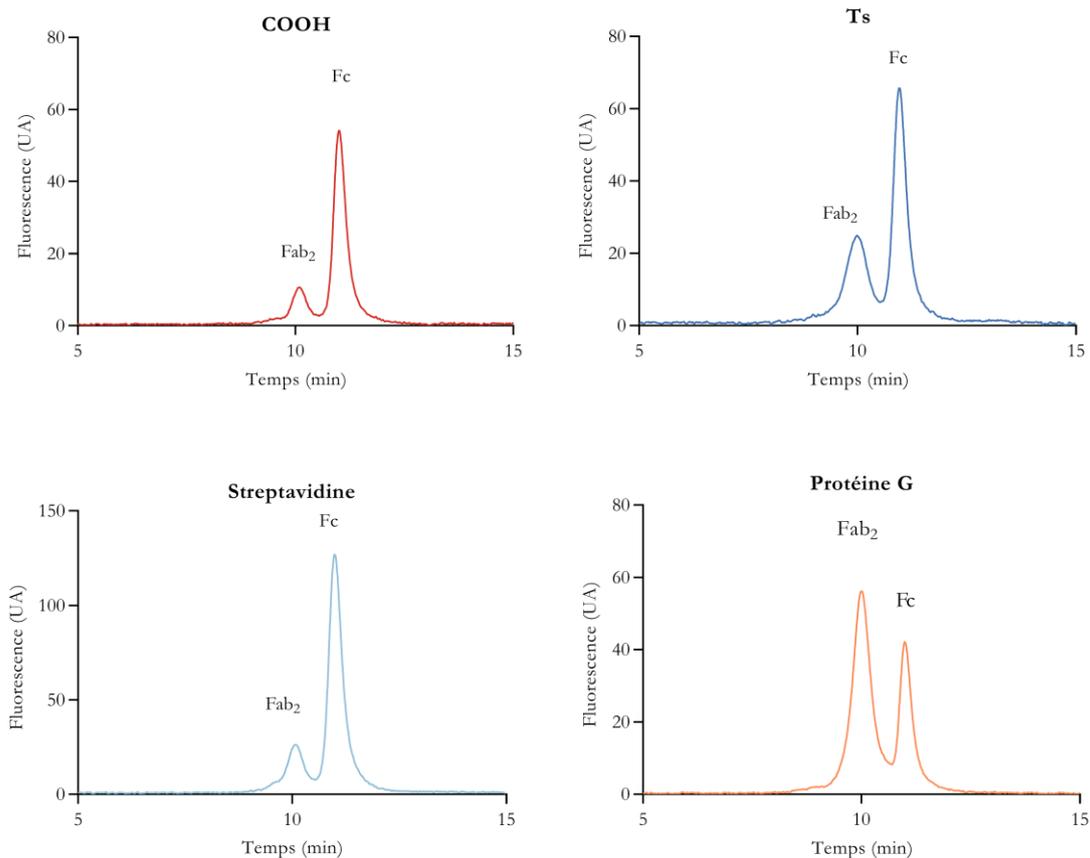


Figure 3 - 15. Chromatogrammes des analyses SEC-FLD des digestats issus de la digestion par l'*IdeS* des différentes billes magnétiques greffées avec des hIgG. Conditions d'analyse identique à la Figure 3 - 7. Les volumes d'injection ne sont pas identiques pour les 4 billes (1 μ L pour les billes Protéine G et Ts, 3 μ L pour les billes COOH et Streptavidine).

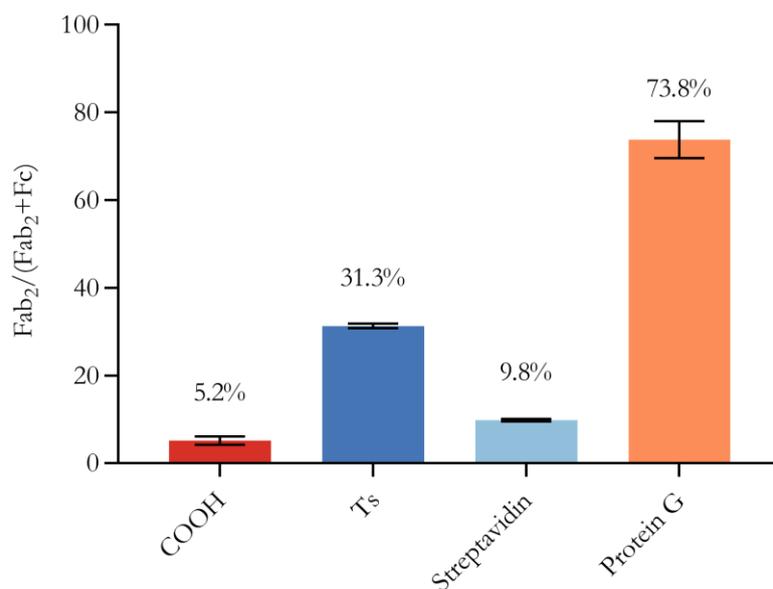


Figure 3 - 16. Évaluation du pourcentage d'hIgG orientées avec le fragment Fab₂ libre sur les différents types de billes.

Le rendement de digestion $\%_{\text{digérée}}$ est directement corrélé à la biodisponibilité des hIgG sur la surface de la bille. En effet, nous avons supposé que l'*IdeS*, du fait de sa taille relativement importante (37 kDa), ne peut pas complètement digérer toutes les hIgG greffées sur la bille, ne pouvant pas accéder à la région charnière de certaines molécules d'hIgG recouvertes par d'autres couches d'anticorps. Cela amènerait à une digestion partielle et donc une sous-estimation de la quantité d'anticorps sur la surface de la bille. Cependant, nous pouvons également supposer que les hIgG non digérées par l'*IdeS*, car non atteignable par l'enzyme, sont également difficiles d'accès pour la capture d'un antigène donné, et donc non « bioréactives ». Le rendement de digestion donne ainsi une indication sur le potentiel de capture d'un antigène par une bille biofonctionnalisée.

Les résultats pour chaque bille sont présentés sur la **Figure 3 - 17**. Nous observons que les billes Ts présentent le rendement de digestion le plus élevé (46.3%), suivies par les billes Streptavidine (37.5%) et les billes Protéine G (34.2%). Les billes COOH affichent le rendement le plus faible avec seulement 5.6%. Le moins bon rendement des billes Protéine G par rapport aux billes Ts peut s'expliquer par la plus forte densité de greffage des hIgG sur cette bille, occasionnant davantage de gêne stérique lors de l'approche de l'*IdeS*, diminuant le rendement de la digestion [11].

Pour conclure, les billes Protéine G permettent un greffage des hIgG avec la meilleure orientation mais aussi la plus grande densité d'anticorps par bille. Cela peut s'expliquer par un recouvrement important de la bille en Protéine G, chaque protéine étant capable de se lier à deux molécules d'IgG. De plus, les Protéine G ont la capacité à lier spécifiquement les IgG par leur fragment Fc. Au contraire, les mécanismes de greffage des autres billes reposent sur des liaisons covalentes (pour COOH et Ts) et non covalentes (pour les billes Streptavidine) avec des acides aminés présents à de multiples endroits de l'anticorps, résultant en une orientation plus aléatoire. De plus, dans le cas des billes Streptavidine, l'étape préalable de biotinylation est aussi une limite importante car elle diminue très probablement le rendement d'anticorps biotinylés et donc la quantité d'anticorps immobilisables sur la bille.

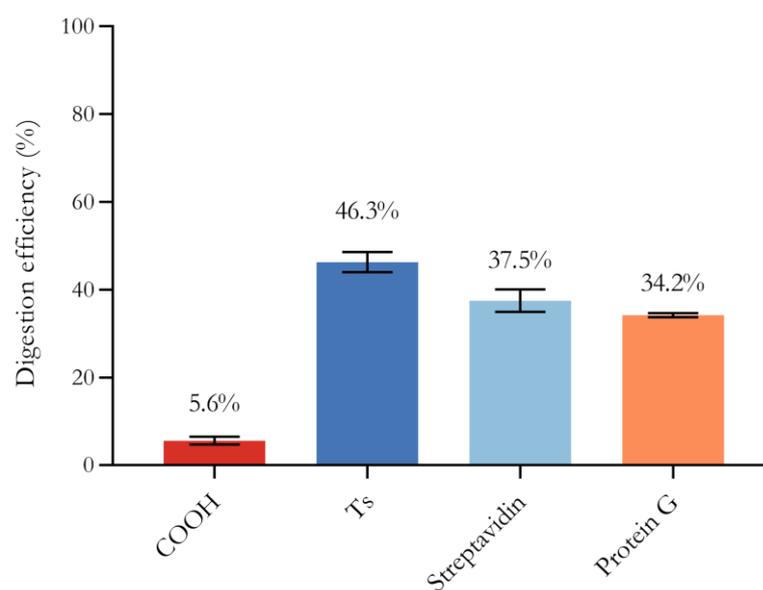


Figure 3 - 17. Evaluation de l'efficacité de la digestion des différentes billes par l'*IdeS*

Par ailleurs, sur le plan pratique, les protocoles de greffage des différentes billes diffèrent par leur facilité de mise en œuvre. Ainsi, les billes Protéine G sont greffées en moins de deux heures avec des réactifs assez communs et à température ambiante. Pour les billes Streptavidine, l'étape de biotinylation préalable des anticorps est une importante limite. Enfin, pour les billes Ts et COOH, les protocoles nécessitent plus de 16h d'incubation, à des températures de 37 et 4°C respectivement ainsi que l'utilisation de réactifs nécessitant une préparation plus contraignante (EDC/S-NHS doivent être utilisés frais, les tampons borate et ammonium doivent être minutieusement préparés et ajustés en pH). Les billes Protéine G sont donc les billes les plus performantes pour assurer une efficacité de greffage des anticorps et une détection optimale de l'antigène en un temps réduit.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Shen *et al* pour l'étude de billes ProtA/ProtG avec 62 000 IgG par bille de 1.5 μm et 77% des anticorps correctement orientés. En revanche, les résultats obtenus pour les billes COOH diffèrent, avec 59 000 IgG par billes dans leur étude et 57% d'orientation. Cette différence peut s'expliquer par leur mode opératoire se basant sur la digestion totale des protéines par la trypsine, sans possibilité de distinguer les peptides issus d'un des deux fragments Fab. Ainsi, des peptides issus d'un fragment Fab pourraient être détectés alors que l'anticorps est immobilisé par l'autre fragment Fab, occasionnant une surestimation de l'orientation. Notre étude permet ainsi une meilleure discrimination grâce à la spécificité de la digestion par l'*IdeS* et l'analyse non dénaturante des fragments par SEC-FLD.

Afin de confirmer les performances des différentes billes étudiées précédemment pour la capture d'antigène, nous avons souhaité réaliser un immunodosage sur bille du TNF- α . Cela permet ainsi d'étudier la détection et la quantification de cette cytokine selon un protocole proche des mécanismes envisagés dans le biocapteur développé dans ce projet de thèse.

3. Application à l'immunodosage et l'immunocapture du TNF- α

3.1. Immunodosage du TNF- α sur billes Ts et Protéine G

Dans le dispositif final, les billes sont fonctionnalisées avec un anticorps anti-TNF- α et forment un immunocomplexe avec d'autres anticorps immobilisés sur une surface en PDMS. Ici, nous avons d'abord voulu étudier ce processus dans un environnement plus classique, en tube, selon le protocole prévu initialement pour les billes. Pour cela, un kit ELISA standard pour le TNF- α a été adapté aux billes. Les kits ELISA fonctionnent généralement sur des microplaques dont les puits sont recouverts d'anticorps et après plusieurs étapes d'incubation, un signal optique est mesuré (absorbance UV-visible, luminescence, fluorescence...) pour la quantification (voir Chapitre 1).

Dans notre cas, nous avons utilisé un kit ELISA pour le TNF- α humain Invitrogen (Life Technologies) comprenant une solution d'anticorps de capture anti-TNF- α , des standards de TNF- α humain, une solution d'anticorps de détection biotinylés, une solution bloquante pour l'adsorption non spécifique, une solution d'avidin-HRP et une solution de TMB pour la détection colorimétrique. Le protocole commercial a été adapté pour convenir aux billes (voir **Figure 3 - 18**).

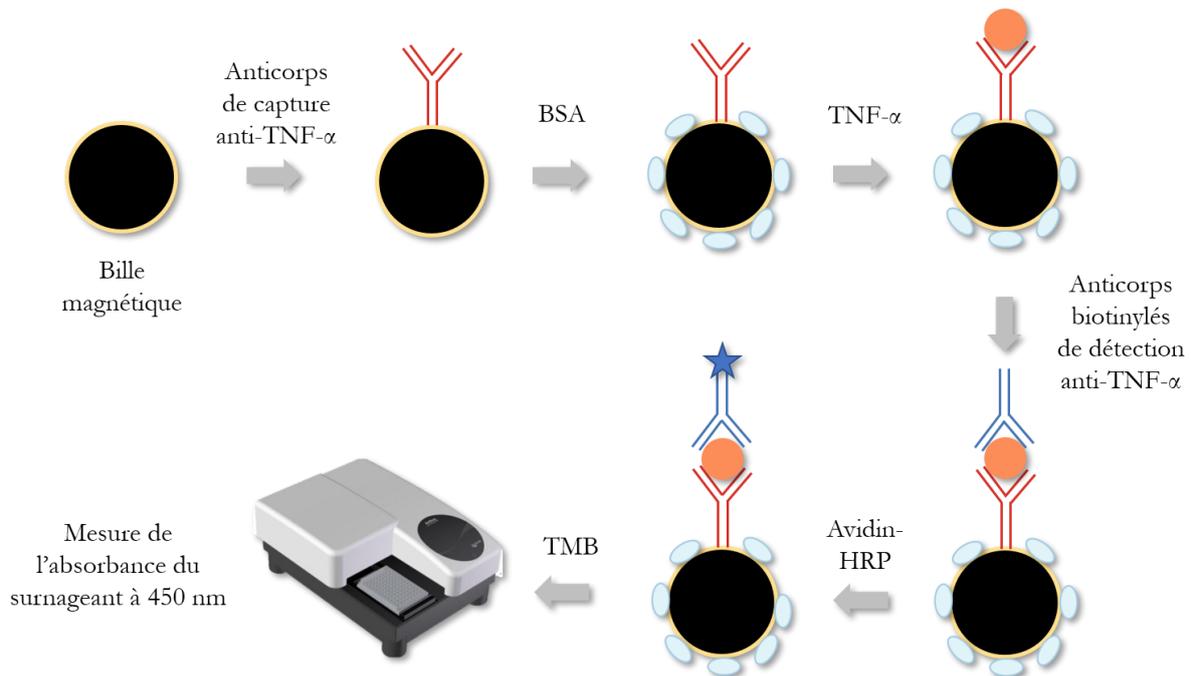


Figure 3 - 18. Protocole d'immunodosage du TNF- α sur billes magnétiques

Pour le greffage des billes, la proportion billes/anticorps est très importante pour assurer un greffage de qualité pour éviter une saturation de la bille. Il s'agit également de s'assurer que suffisamment d'anticorps sont immobilisés sur la surface de la bille pour une bonne détection et éviter la saturation du signal quand la concentration en antigène augmente. Pour connaître la concentration en anticorps de la solution d'anticorps de capture fournie dans le kit (car non renseigné par le fournisseur), un test BCA a été réalisé et une concentration de 1.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été obtenue.

La gamme de détection du kit est indiquée entre 2 et 500 pg/mL . Nous avons alors choisi de réaliser les immunodosages sur cette gamme de valeur afin de vérifier le bon déroulement du protocole sur un support différent des microplaques, à savoir : les billes magnétiques. Les solutions de TNF- α employées dans ces expériences sont donc celles issues des standards proposés dans le kit ELISA commercial, entre 0 et 500 pg/mL .

3.1.1. Immunodosage sur billes Ts

Le protocole d'immunodosage sur billes a d'abord été développé pour les billes Ts qui montraient de bonnes performances dans d'autres projets de l'équipe PNAS (Institut Galien Paris-Sud). La procédure exacte est détaillée en annexe. Elle est le résultat de plusieurs optimisations, notamment sur la quantité d'anticorps/billes et sur les procédures de rinçage afin de réduire l'adsorption non-spécifique.

Avec ces optimisations, nous sommes parvenus à une linéarité de la réponse en absorbance pour des concentrations de TNF- α entre 5 et 500 pg/mL ($R^2=0.95$) et une limite de détection de 5 pg/mL , proche de celle obtenue sur microplaque et donnée par le kit, validant la procédure d'immunodosage sur les billes Ts. Par ailleurs, cette concentration est dans la gamme de valeur du

TNF- α en milieu biologique dans les pathologies d'intérêt, comme explicité dans le chapitre 1. Les billes Ts restent donc de bonnes candidates pour l'immunodosage sur billes du TNF- α .

3.1.2. Immunodosage sur billes Protéine G

Pour comparer les performances des billes Ts aux billes Protéine G, nous avons souhaité développer un protocole similaire d'immunodosage avec le kit ELISA TNF- α . Cependant, dans le cas des billes Protéine G, une saturation de l'absorbance survient quelle que soit la concentration en TNF- α (même en l'absence de TNF- α).

Nous avons initialement supposé que de l'adsorption non-spécifique avait lieu sur les billes, et que la BSA jusqu'ici utilisée n'était pas efficace car les billes Protéine G ont une surface hydrophile. Nous avons donc essayé de saturer la bille avec des anticorps de lapin (non reconnu par les Protéines G en surface) après la première étape de greffage afin d'occuper les sites non spécifiques restant, sans effet malgré tout. D'après le fournisseur, les billes sont recouvertes d'un agent *anti-fouling*, mais dont la composition est protégée. Aussi, malgré nos tentatives, la procédure d'immunodosage sur bille n'a pas pu être reproduite sur les billes Protéine G. Des méthodes de quantification alternatives auraient pu être essayées (fluorescence, chimiluminescence, etc.) afin de pallier les éventuelles interférences de billes avec le kit, mais la comparaison avec les expériences sur billes Ts auraient été plus difficiles. Nous avons alors opté pour une procédure indirecte de capture puis élution, comme décrit dans la partie suivante.

3.2. Immunocapture et élution du TNF- α sur billes Ts, COOH et Protéine G

Afin de comparer les performances des différentes billes précédemment étudiées pour une application d'intérêt pour ce projet de thèse, nous avons choisi d'effectuer une immunocapture du TNF- α humain par les billes fonctionnalisées avec des anticorps anti-TNF- α . Puis, la quantification directe sur bille n'étant pas compatible avec toutes les billes comme illustrée par la partie précédente, nous avons procédé à l'élution de l'antigène capturé et sa quantification selon un protocole ELISA réalisé sur microplaque.

Pour cela, 1 mg de billes magnétiques COOH, Ts et Protéine G ont été greffés avec des anticorps monoclonaux anti-TNF- α humain issu du kit ELISA Invitrogen mentionné précédemment, selon la procédure de greffage décrite dans la partie 2.2. Les billes Streptavidine n'ont pas été incluses dans cette expérience en raison de leur faible performance par comparaison aux billes Ts et Protéine G. Par ailleurs, le protocole du kit ELISA utilisant des anticorps biotinylés et de l'avidine-HRP, des interférences auraient pu survenir entre les différentes molécules.

Ainsi, 5 réplicas de 100 μ g de billes greffées de chaque type sont incubés pendant 4h à 25°C avec 5 ng de TNF- α humain (Sigma Aldrich) dans 250 μ L de PBS (1X). Trois échantillons de contrôle ne comprenant que les billes et du PBS sont également préparés. Les billes sont rincées avec 500 μ L de PBS, Tween 20 (0.05%) pendant 10 minutes à 800 rpm sur le Thermomixer. Elles sont ensuite chauffées à 95°C pendant 5 minutes dans 250 μ L de PBS pour procéder à une élution thermique du TNF- α . Ce protocole a déjà été utilisé pour des billes magnétiques Dynabeads [26]. En effet, le TNF- α devant ensuite être quantifié par ELISA, l'intégrité de la protéine doit être assurée pour la qualité du test ELISA.

Les éluats sont alors préparés à trois concentrations différentes : non dilué, 10 et 100 fois dilués afin d'assurer que la concentration d'antigène dans les éluats correspondent à la gamme d'analyse du kit ELISA (2-500 pg/mL). Les éluats sont enfin analysés par le kit ELISA en duplicats et quantifiés par spectrométrie d'absorbance comme dans la partie 3.1.1. Deux courbes de calibration différentes permettant la quantification ont été réalisées : l'une avec une dilution en série d'une solution mère de TNF- α à 500 pg/mL dans le PBS ; l'autre, préparée de manière identique mais ayant subi le même traitement thermique que les billes (95°C, 5 min.). Cela est fait afin de prendre en compte les effets thermiques de l'éluion sur le TNF- α qui pourrait avoir un effet sur la détection du test ELISA. Les deux courbes sont représentées sur la **Figure 3 - 19**.

Nous pouvons observer une diminution de 40% de la pente après traitement thermique. Sans prendre en compte l'influence de l'éluion sur la détection, les concentrations de TNF- α élué pour chaque bille auraient été sous-estimées.

Finalement, pour les 3 billes étudiées, avec 5 ng de TNF- α pour 100 μ g de billes, 67.6% du TNF- α initial a été capturé et élué par les billes Protéine G, contre 6.6% et 2.8% pour les billes COOH et Ts respectivement (voir **Tableau 3 - 3**).

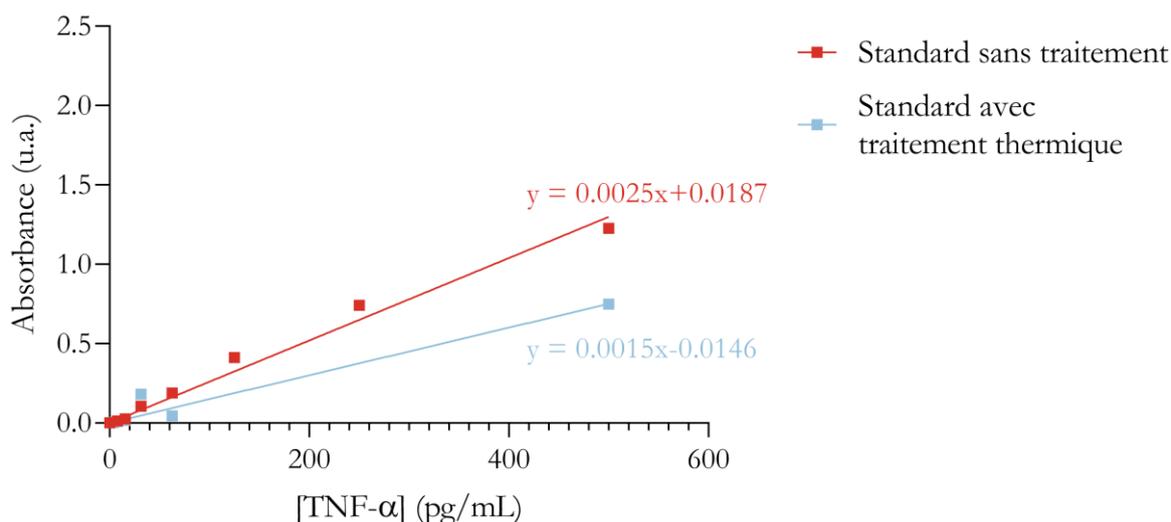


Figure 3 - 19. Courbes de calibration de l'absorbance de la solution de TNF- α en fonction de l'origine du standard et des traitements subis

Tableau 3 - 3. Quantité de TNF- α éluée par type de billes avec 5 ng de TNF- α pour 100 μ g de billes

	Billes COOH	Billes Ts	Billes Protéine G
Pourcentage de la quantité initiale de TNF- α retrouvée après éluion thermique	6.6 \pm 1.0 %	2.8 \pm 0.04 %	67.6 \pm 11.4 %

Les résultats sont bien en adéquation avec l'analyse par SEC-FLD des billes, soutenant de meilleures performances des billes Protéine G : elles présentent plus d'anticorps en surface qui sont mieux orientés, les billes capturent donc plus d'antigènes. Pour les billes Ts et COOH, les performances sont particulièrement mauvaises pour cette application, probablement du fait d'une mauvaise orientation des anticorps en surface et/ou un faible recouvrement des billes. Par ailleurs, il est nécessaire de garder à l'esprit que l'éluion thermique n'assure pas forcément une éluion complète de tous les antigènes capturés et de manière similaire sur chaque type de bille.

Pour résumer, l'étude par digestion enzymatique et analyse SEC-FLD des billes magnétiques commerciales a montré les meilleures performances des billes Pierce Protéine G, avec une meilleure orientation des anticorps et un meilleur recouvrement de la bille. Cela a ensuite été confirmé par une application sur le TNF- α , pour la capture et l'éluion de l'antigène. Ce protocole analytique original permet donc l'évaluation de l'orientation d'anticorps sur une surface (billes ou autres) en reposant sur la digestion hautement spécifique des IgG par l'*IdeS* et une analyse haute résolution des fragments par SEC, capable d'identifier et de quantifier avec précision les fragments. De plus, plusieurs effets ont été ici pris en compte pour la première fois : l'influence des conditions de greffage des billes sur le signal FLD des protéines, la contribution de l'*IdeS* au signal FLD de l'analyse SEC et enfin l'adsorption éventuel de l'*IdeS* sur la surface des billes.

Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons essayé de comprendre les problématiques entourant le principe d'immunodosage/immunocapture d'antigène par des billes magnétiques. Pour cela, nous avons tout d'abord présenté les différentes propriétés des billes étudiées ainsi que l'intérêt de s'intéresser à leur bioréactivité, et en particulier l'orientation et le recouvrement des anticorps à leur surface. Nous avons alors présenté quelques études ayant déjà abordé partiellement ces problématiques, soulignant que très peu d'études s'étaient intéressées conjointement à la question de l'orientation et du recouvrement des anticorps.

Aussi, nous avons proposé une méthode analytique par SEC-FLD basée sur la digestion enzymatique des anticorps greffés en surface par une enzyme hautement spécifique des anticorps IgG, l'*IdeS*. Nous avons alors comparé différentes billes entre elles, et conclu que les billes magnétiques Pierce Protéine G offraient les meilleures performances de greffage et un protocole rapide et simple. Ces observations ont été alors confirmées en utilisant ces billes pour l'immunocapture du TNF- α et son élution pour quantification par test ELISA. Les billes Protéine G sont donc bien supérieures aux billes Ts, COOH et Streptavidine pour l'application visée dans cette thèse, à savoir l'immunocapteur du TNF- α .

Ainsi, les chapitres 2 et 3 ont permis d'aborder d'une part la fabrication d'une chambre microfluidique biofonctionnalisée avec des anticorps pour la détection du TNF- α , et d'autre part la détermination des meilleures billes magnétiques comme vecteur du TNF- α pour la capture et formation de l'immunocomplexe au sein de la chambre. Il reste désormais à présenter le dispositif de manipulation et de capture des billes au sein de la puce microfluidique composé de microbobines de cuivre fabriquées en salle blanche.

Bibliographie

- [1] J.M. Hayes, E.F.J. Cosgrave, W.B. Struwe, M. Wormald, G.P. Davey, R. Jefferis, P.M. Rudd, Glycosylation and Fc receptors, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 382 (2014) 165–199. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_8.
- [2] M.E. Wiseman, C.W. Frank, Antibody adsorption and orientation on hydrophobic surfaces, *Langmuir*. 28 (2012) 1765–1774. doi:10.1021/la203095p.
- [3] A.K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof, Antibody orientation on biosensor surfaces: A minireview, *Analyst*. 138 (2013) 1619–1627. doi:10.1039/c2an36787d.
- [4] N.G. Welch, J.A. Scoble, B.W. Muir, P.J. Pigram, Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review), *Biointerphases*. 12 (2017) 02D301. doi:10.1116/1.4978435.
- [5] G. Ruiz, K. Tripathi, S. Okyem, J.D. Driskell, pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 1182–1191. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00123.
- [6] S. Liu, J. Horak, M. Höldrich, M. Lämmerhofer, Accurate and reliable quantification of the protein surface coverage on protein-functionalized nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*. 989 (2017) 29–37. doi:10.1016/j.aca.2017.08.004.
- [7] H.Y. Song, X. Zhou, J. Hobley, X. Su, Comparative study of random and oriented antibody immobilization as measured by dual polarization interferometry and surface plasmon resonance spectroscopy, *Langmuir*. 28 (2012) 997–1004. doi:10.1021/la202734f.
- [8] H.Y. Song, J. Hobley, X. Su, X. Zhou, End-on Covalent Antibody Immobilization on Dual Polarization Interferometry Sensor Chip for Enhanced Immuno-sensing, *Plasmonics*. 9 (2014) 851–858. doi:10.1007/s11468-014-9680-9.
- [9] Z. Zhang, A. Marie Woys, K. Hong, C. Grapentin, T.A. Khan, I.E. Zarraga, N.J. Wagner, Y. Liu, Adsorption of non-ionic surfactant and monoclonal antibody on siliconized surface studied by neutron reflectometry, *J. Colloid Interface Sci.* 584 (2021) 429–438. doi:10.1016/j.jcis.2020.09.110.
- [10] X. Zhao, F. Pan, B. Cowsill, J.R. Lu, L. Garcia-Gancedo, A.J. Flewitt, G.M. Ashley, J. Luo, Interfacial immobilization of monoclonal antibody and detection of human prostate-specific antigen, *Langmuir*. 27 (2011) 7654–7662. doi:10.1021/la201245q.
- [11] R. Kozłowski, A. Ragupathi, R.B. Dyer, Characterizing the Surface Coverage of Protein-Gold Nanoparticle Bioconjugates, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 2691–2700. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00366.
- [12] Z. Pei, H. Anderson, A. Myrskog, G. Dunér, B. Ingemarsson, T. Aastrup, Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity, *Anal. Biochem.* 398 (2010) 161–168. doi:10.1016/j.ab.2009.11.038.
- [13] E.T. Harrison, Y.-C. Wang, L. Carter, D.G. Castner, Characterizing protein G B1 orientation and its effect on immunoglobulin G antibody binding using XPS, ToF-SIMS, and quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, *Biointerphases*. 15 (2020) 021002. doi:10.1116/1.5142560.
- [14] K. Gajos, A. Budkowski, V. Pagkali, P. Petrou, M. Biernat, K. Awsiuk, J. Rysz, A. Bernasik, K. Misiakos, I. Raptis, S. Kakabakos, Indirect immunoassay on functionalized silicon surface: Molecular arrangement, composition and orientation examined step-by-step with multi-technique and multivariate analysis, *Colloids Surfaces B Biointerphases*. 150 (2017) 437–444. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.11.009.
- [15] V. Lebec, J. Landoulsi, S. Boujday, C. Poleunis, C.M. Pradier, A. Delcorte, Probing the orientation of β -lactoglobulin on gold surfaces modified by alkyl thiol self-assembled monolayers, *J. Phys. Chem. C*. 117 (2013) 11569–11577. doi:10.1021/jp311964g.
- [16] S. Liu, E. Haller, J. Horak, M. Brandstetter, T. Heuser, M. Lämmerhofer, Protein A- and

- Protein G-gold nanoparticle bioconjugates as nano-immunoaffinity platform for human IgG depletion in plasma and antibody extraction from cell culture supernatant, *Talanta*. 194 (2019) 664–672. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.079.
- [17] S. Liu, E. Haller, J. Horak, M. Brandstetter, T. Heuser, M. Lämmerhofer, Protein A- and Protein G-gold nanoparticle bioconjugates as nano-immunoaffinity platform for human IgG depletion in plasma and antibody extraction from cell culture supernatant, *Talanta*. 194 (2019) 664–672. doi:10.1016/j.talanta.2018.10.079.
- [18] D. Bouzas-Ramos, L. Trapiella-Alfonso, K. Pons, J.R. Encinar, J.M. Costa-Fernández, V. Tsatsaris, N. Gagey-Eilstein, Controlling Ligand Surface Density on Streptavidin-Magnetic Particles by a Simple, Rapid, and Reliable Chemiluminescent Test, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 2646–2653. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00347.
- [19] L. Zhang, D. Hu, M. Salmain, B. Liedberg, S. Boujday, Direct quantification of surface coverage of antibody in IgG-Gold nanoparticles conjugates, *Talanta*. 204 (2019) 875–881. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.104.
- [20] M. Ammar, C. Smadja, L. Giang Thi Phuong, M. Azzouz, J. Vigneron, A. Etcheberry, M. Taverna, E. Dufour-Gergam, A new controlled concept of immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer's biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 40 (2013) 329–335. doi:10.1016/j.bios.2012.07.072.
- [21] J.E. Butler, Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays, *Methods*. 22 (2000) 4–23. doi:10.1006/meth.2000.1031.
- [22] Z. Chen, A. Sadana, An analysis of antigen-antibody binding kinetics for biosensor applications utilized as a model system: influence of non-specific binding, 1996.
- [23] M. Shen, D. Jiang, P.I.T. De Silva, B. Song, J.F. Rusling, Restricted Proteolysis and LC-MS/MS to Evaluate the Orientation of Surface-Immobilized Antibodies, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4913–4919. doi:10.1021/acs.analchem.9b01155.
- [24] B. Vincents, U. Von Pawel-Rammingen, L. Björck, M. Abrahamson, Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, *ides*, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding, *Biochemistry*. 43 (2004) 15540–15549. doi:10.1021/bi048284d.
- [25] W. Choe, T.A. Durgannavar, S.J. Chung, Fc-binding ligands of immunoglobulin G: An overview of high affinity proteins and peptides, *Materials (Basel)*. 9 (2016). doi:10.3390/ma9120994.
- [26] T.D. Mai, I. Pereiro, M. Hiraoui, J.L. Viovy, S. Descroix, M. Taverna, C. Smadja, Magneto-immunocapture with on-bead fluorescent labeling of amyloid- β peptides: towards a microfluidized-bed-based operation, *Analyst*. 140 (2015) 5891–5900. doi:10.1039/c5an01179e.

Chapitre 4

Fabrication d'un dispositif microfluidique pour la capture
de billes magnétiques fonctionnalisées

Sommaire

Introduction.....	199
1. Réalisation des microbobines de capture	200
1.1. Contexte et dimensionnement des bobines.....	200
1.1.1.Contexte de l'étude	200
1.1.2.Etude du dimensionnement et des effets thermiques des bobines.....	202
1.2. Présentation générale du procédé de fabrication.....	210
1.2.1.Préparation du substrat de silicium.....	213
1.2.2.Premier niveau : la sous-piste de cuivre.....	214
1.2.3.Deuxième niveau : isolation de la sous-piste.....	218
1.2.4.Troisième niveau : croissance des bobines de cuivre.....	220
1.2.5.Conditionnement des microbobines.....	225
1.2.6.Intégration du circuit microfluidique et soudure des fils électriques.....	226
1.3. Fabrication d'un système de capture optimisé avec substrat magnétique	228
1.3.1.Micromoulage des bases de Permalloy	229
1.3.2.Isolation électrique des bases de Permalloy	232
2. Caractérisation électrique et fluidiques des dispositifs de capture.....	235
2.1. Caractérisation électrique des microbobines.....	235
2.2. Caractérisation thermoélectrique des bobines.....	238
2.3. Caractérisation fluidique des dispositifs.....	239
3. Application à la capture et à la détection fluorescente de billes magnétiques	240
3.1. Greffage en tube des billes protéine G avec les anticorps fluorescents	241
3.2. Evaluation des conditions de capture des billes par les microbobines.....	242
3.3. Évaluation de la durée de greffage des anticorps sur les billes immobilisées	245
3.4. Greffage et détection des anticorps fluorescents sur les billes immobilisées	247
Conclusion du chapitre 4.....	249
Bibliographie.....	250

Introduction

Dans les deux chapitres précédents, nous avons présenté d'une part, le développement d'une chambre microfluidique biosensible en PDMS pour l'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques et d'autre part, la caractérisation et la sélection des billes magnétiques permettant une capture efficace du TNF- α pour la formation d'un immunocomplexe billes-anticorps-antigène en solution. Ces deux éléments ont ainsi pour but d'être assemblés pour permettre tout d'abord la capture du TNF- α par les billes au sein d'un canal microfluidique puis l'immobilisation de l'immunocomplexe magnétique au sein de la chambre microfluidique pour sa détection et quantification.

Les billes magnétiques protéine G sélectionnées dans le chapitre 3 doivent ainsi être fonctionnalisées avec des anticorps et incubées en présence du TNF- α afin d'en assurer la détection. Pour cela, une capture précise des billes magnétiques dans le canal doit être possible afin de permettre leur fonctionnalisation et leur réaction avec le TNF- α , puis leur acheminement dans la chambre de détection silanisée et biofonctionnalisée. Pour cela, un système de capture des billes magnétiques au sein du canal doit être réalisé.

Ainsi, ce chapitre présente la réalisation du dispositif de capture des billes magnétiques intégrant des microbobines de cuivre fabriquées à partir de procédés de microfabrication en salle blanche. Ces microbobines intégrées doivent générer un champ magnétique très localisé au niveau du canal afin d'assurer une capture des billes efficace, sélective et peu consommatrice en énergie pour minimiser l'échauffement par effet Joule. Nous commencerons par rappeler les enseignements essentiels tirés de la bibliographie et des travaux de recherche effectués au sein de notre laboratoire pour la conception des bobines. Puis nous présenterons le procédé de fabrication des microbobines adapté et optimisé par rapport aux réalisations des travaux de thèse précédents [1,2]. Nous proposerons également la conception d'un système de capture optimisé avec des microbobines intégrant un substrat magnétique en Permalloy ($\text{Fe}_{80}\text{Ni}_{20}$).

Enfin, nous détaillerons la caractérisation électrique et fluide des dispositifs fabriqués avec leur application à la capture et la détection en fluorescence des billes magnétiques protéine G greffées avec des anticorps FITC.

1. Réalisation des microbobines de capture

1.1. Contexte et dimensionnement des bobines

1.1.1. Contexte de l'étude

Nous avons vu dans la partie 3 du chapitre 1 qu'il existe une variété de systèmes de manipulation et de capture des billes magnétiques. Les électroaimants figurent parmi les systèmes les plus versatiles et flexibles pour répondre à ces exigences. Par ailleurs, l'expertise de notre équipe de recherche dans la fabrication de microbobines (électroaimant) a orienté la conception du dispositif de capture et de manipulation des billes magnétiques. Plusieurs travaux sur la conception de microbobines pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) par le département Microsystèmes et Nanobiofluidiques ont permis d'établir des procédés fondamentaux pour leur conception [3,4].

Dans la littérature, les travaux de Fulcrand *et al* [5,6] constituent également un exemple intéressant pour la fabrication de microbobines de cuivre intégrées à un circuit microfluidique. Cette équipe s'est notamment intéressée à la fabrication et la caractérisation de différentes géométries de bobines planaires à un niveau (serpentin, double carré et double spirale) et à trois niveaux (carré et spirale) comme illustré sur la Figure 4 - 1. Ils ont ainsi montré que le champ magnétique généré par les bobines à trois niveaux est supérieur aux bobines à un niveau.

Ils ont ainsi conçu une bobine à trois niveaux, comprenant une sous-piste permettant de relier le centre de la bobine vers les connectiques extérieures. Ils ont également pris soin de reporter ces connectiques en dehors de la zone de capture pour permettre l'intégration du canal microfluidique, comme illustré dans le procédé de fabrication de la Figure 4 - 2.

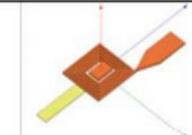
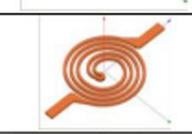
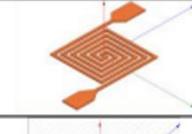
	3D representation	Description
3 levels of metallization		• <u>Spiral micro-coils</u> with 5 to 20 turns.
		• <u>Square micro-coils</u> with 5 to 20 turns.
1 level of metallization		• <u>Double spiral micro-coils</u> with 10 to 20 turns.
		• <u>A double square micro-coil</u> with 10 turns.
		• <u>A serpentine micro-coil</u> with 9 turns

Figure 4 - 1. Les différentes conceptions de bobines étudiées par Fulcrand *et al* [5]

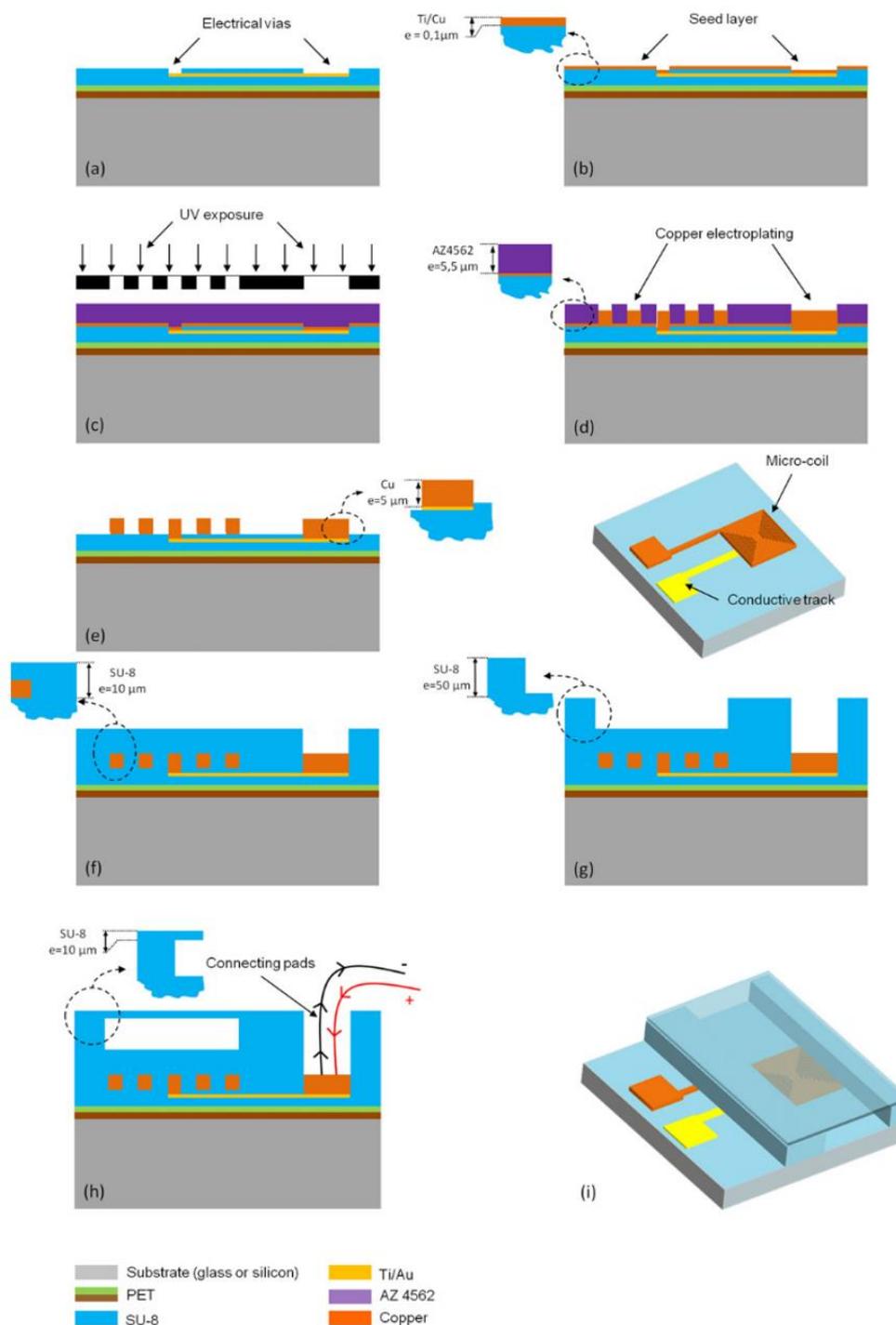


Figure 4 - 2. Procédé de fabrication de microbobines intégrées dans une puce microfluidique (adapté de [6])

Les performances de ces bobines ont alors été évaluées pour la capture de billes magnétiques de $2.8 \mu\text{m}$ au sein du canal. L'intensité du champ magnétique généré par la bobine étant proportionnelle à l'intensité du courant injecté dans la bobine (loi de Biot et Savart), l'optimisation de la capture a d'abord porté sur la détermination de l'intensité électrique nécessaire pour capturer les billes.

En effet, la bille circulant au sein du canal microfluidique est soumise à une force de traînée $F_{\text{traînée}}$ dépendant notamment de la vitesse du fluide V , de sa viscosité η et du rayon de la bille R :

Équation 1

$$\overrightarrow{F_{\text{traînée}}} = 6. \pi. \eta. R. \vec{V}$$

La force magnétique exercée par le champ magnétique généré par la bobine doit donc contrebalancer la force de trainée pour permettre d'immobiliser la bille lors de son passage à proximité de la bobine. Avec un débit de 0.03 $\mu\text{L}/\text{min}$ et une intensité de 100 mA circulant dans une bobine carrée à trois niveaux, Fulcrand *et al* ont réalisé une capture des billes en moins de 2 secondes. Leur dispositif a cependant montré des limites pour la capture de billes plus petites (500 nm) du fait d'une susceptibilité magnétique réduite des billes de cette dimension [6]. Par ailleurs, ils ont également mesuré l'échauffement par effet Joule de la bobine au passage du courant. Ils ont ainsi mis en évidence que la géométrie de la bobine (notamment le nombre de tours) influence grandement l'échauffement pour une intensité donnée. Aussi, un compromis doit être trouvé pour l'intensité du courant afin de générer un champ suffisamment intense pour assurer la capture des billes à un débit fluide donné tout en minimisant l'échauffement de la bobine et du canal. Cette étude a ainsi constitué un point de départ important pour la conception des microbobines au sein du laboratoire.

1.1.2. Etude du dimensionnement et des effets thermiques des bobines

Au sein du département Microsystèmes et Nanobiofluidiques du C2N, les travaux de thèse de Ha Hong Cao [1] ont notamment porté sur une étude similaire pour la conception de bobines carrées à trois niveaux. Ha Hong Cao a plus particulièrement simulé plusieurs géométries de bobines afin d'en étudier les propriétés magnétiques et de sélectionner les bobines dont les dimensions permettraient d'assurer un environnement de capture optimal pour différentes tailles de billes magnétiques. Nous allons donc brièvement rappeler les points essentiels de ces travaux afin de préciser le dimensionnement des bobines, les paramètres d'influence sur l'efficacité de capture et les géométries retenues pour notre étude.

1.1.1.1. Dimensionnement des bobines

A partir d'une simulation magnétique par éléments finis, les profils de champ magnétique généré par les microbobines ont pu être représentés selon les différents paramètres géométriques. Parmi ces paramètres géométriques, nous trouvons : le nombre de tours (N) de fils de la bobine, le rayon extérieur (R) de la bobine, la largeur des spires (L) et la distance entre chaque spire S (voir Figure 4 - 3).

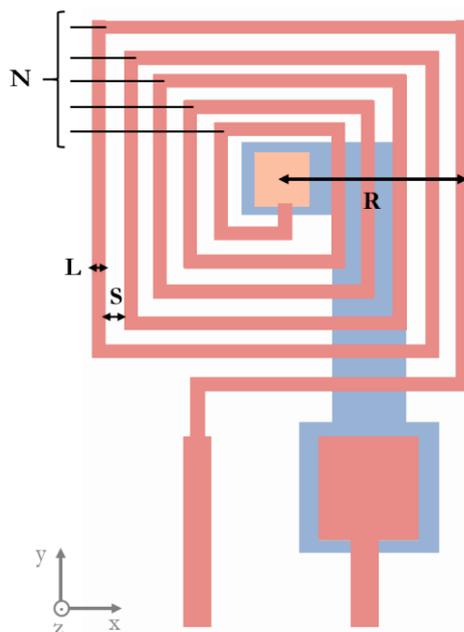
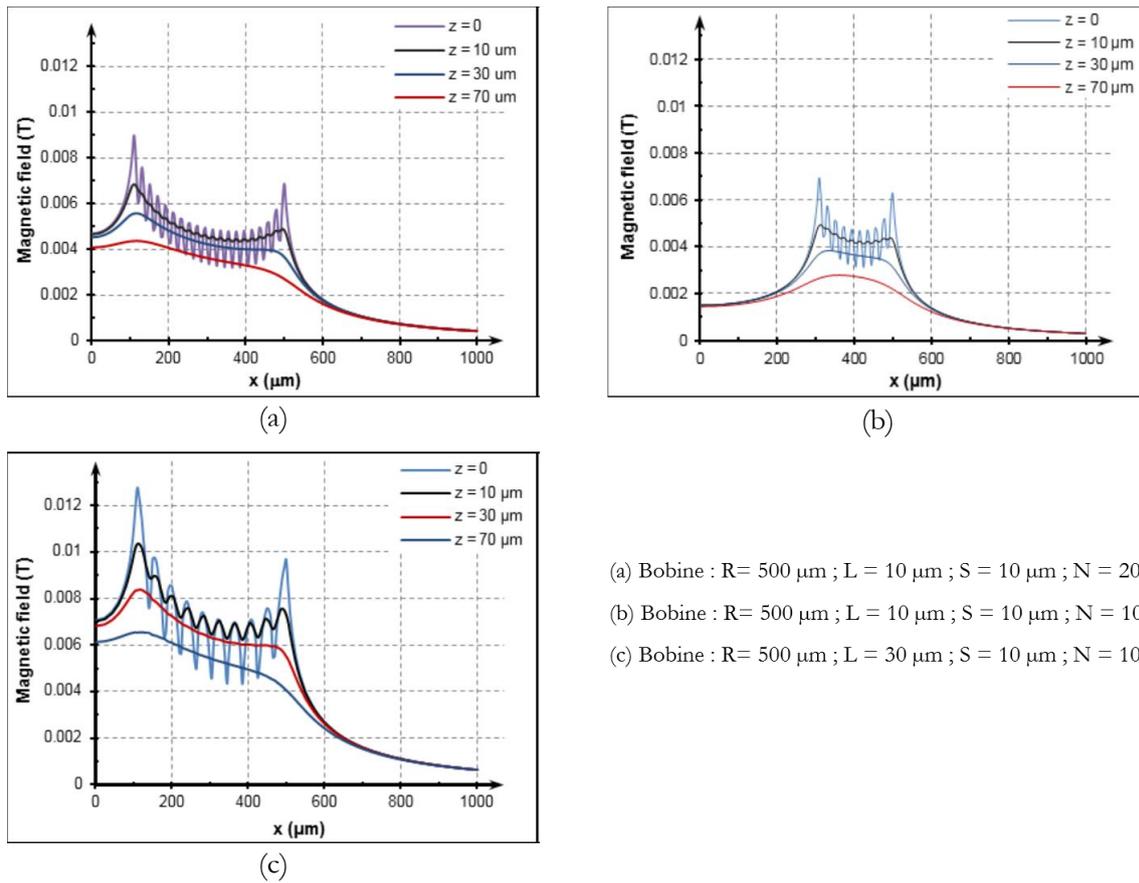


Figure 4 - 3. Schéma des différents paramètres géométriques variables pour la conception des microbobines ; R rayon extérieur ; L largeur d'une spire ; S distance inter-spire ; N nombre de tours de spire

La Figure 4 - 4 représente les profils de densité de champ magnétique obtenus pour différentes géométries de bobines selon l'axe x de la bobine et pour différentes distance z au-dessus de la bobine (voir repère sur la Figure 4 - 3). Nous pouvons remarquer que la densité de champ magnétique diminue au fur et à mesure que la distance z par rapport à la bobine augmente. Pour $z < 10 \mu\text{m}$, la densité de champ magnétique est très intense et montre de fortes oscillations. Ces fortes variations peuvent notamment améliorer la capture des billes car la force du champ magnétique exercée sur la bille est proportionnelle à la fois à l'intensité du champ et à la variation du champ (gradient). Aussi, nous pouvons supposer une capture préférentielle des billes dans les zones de fort gradient magnétique pour une intensité de champ donnée. Cela nous indique qu'il faudra minimiser la distance entre les billes et la bobine au sein du canal afin d'assurer un champ magnétique suffisamment intense. Il faudra donc que la couche de protection en PDMS au-dessus des bobines permettant de les isoler du contenu du canal soit la plus fine possible.

Par ailleurs, la Figure 4 - 4 nous montre également la variation de la densité de champ en fonction de certains paramètres géométriques. Entre la Figure 4 - 4b et la Figure 4 - 4c, la largeur L des spires varie de 10 à 30 μm . Les oscillations du champ sont plus intenses pour des spires plus larges et des distances faibles par rapport à la bobine ($z < 10 \mu\text{m}$). En revanche, ces différences entre les deux géométries s'atténuent au-delà de 30 μm ; ce qui signifie que pour des canaux microfluidiques de plus de 30 μm d'épaisseur, l'influence de la largeur des spires de la bobine sur le gradient de champ magnétique sera négligeable.



(a) Bobine : $R= 500 \mu\text{m}$; $L= 10 \mu\text{m}$; $S= 10 \mu\text{m}$; $N= 20$

(b) Bobine : $R= 500 \mu\text{m}$; $L= 10 \mu\text{m}$; $S= 10 \mu\text{m}$; $N= 10$

(c) Bobine : $R= 500 \mu\text{m}$; $L= 30 \mu\text{m}$; $S= 10 \mu\text{m}$; $N= 10$

Figure 4 - 4. Simulation des profils de densité de flux magnétique de 3 bobines de géométries différentes selon l'axe x de la bobine et pour différentes distances z au-dessus de la bobine (adapté de [1])

La Figure 4 - 5A représente la variation générale du profil de la densité de champ magnétique B pour des bobines de même rayon mais de nombre de tours différents. Nous pouvons remarquer que la valeur moyenne du module B augmente avec le nombre de tours, et donc la valeur moyenne de la force exercée sur les billes dans le canal également. De plus, le ratio de la valeur maximale du module de B (B_{max}) et minimale (B_{min}) atteintes à la surface de la bobine augmente. Ce ratio $B_{\text{max}}/B_{\text{min}}$ permet de représenter l'homogénéité du champ généré à la surface de la bobine. Les billes seront capturées sur les bords de la bobine ou sur sa surface entière dépendamment de l'homogénéité du champ.

La Figure 4 - 5B représente la variation du ratio $B_{\text{max}}/B_{\text{min}}$ en fonction du nombre de tours de la bobine et pour différentes largeurs de spires. L'homogénéité du champ est maximale pour un ratio $B_{\text{max}}/B_{\text{min}}$ minimal. Nous pouvons observer que cette condition se vérifie par une diminution du nombre de tours, quelle que soit la largeur des spires. Or cela signifie également que l'intensité maximale du champ diminue d'après la Figure 4 - 5A. Ainsi, une capture homogène des billes implique également une plus faible capacité de capture en raison d'une densité de champ magnétique plus faible.

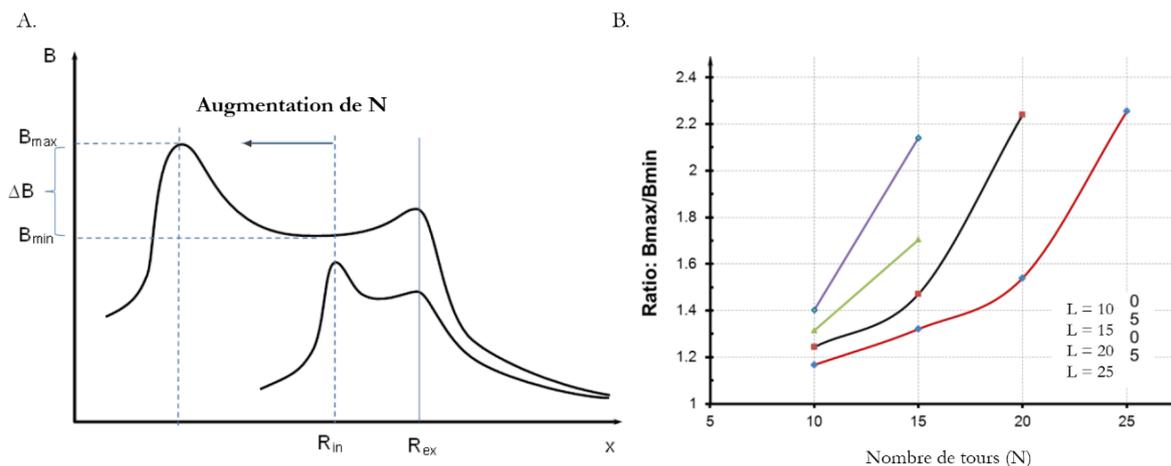


Figure 4 - 5. A. Représentation schématique du profil de la densité de champ magnétique B pour des bobines de rayon identique mais de nombre de tours N variable ; **B.** Homogénéité de la densité de champ magnétique (B_{\max}/B_{\min}) en fonction du nombre de tours N et de la largeur L des spires pour un rayon $R = 500 \mu\text{m}$ de la bobine (adapté de [1])

Par ailleurs, pour un même rayon extérieur de bobine, le nombre de tours N , la largeur des spires L et la distance inter-spire S peuvent être différentes (voir Figure 4 - 6A). Les minimums des paramètres L et S sont notamment fixés par la résolution des étapes de microfabrication, et notamment de l'étape de photolithographie avant le micromoulage des bobines de cuivre. Cette résolution ne peut difficilement descendre sous quelques microns. La surface remplie par le cuivre sur le motif de la bobine peut alors être définie par le taux de remplissage suivant :

Équation 2

$$\text{Taux de remplissage en Cu des bobines (\%)} = \frac{N \cdot L}{R}$$

La distance inter-spire S a alors été fixée à $10 \mu\text{m}$ comme limite basse pour assurer une bonne résolution lors du micromoulage du cuivre. Le taux de remplissage augmente avec le nombre de tours N . Sa limite haute est obtenue par le ratio de la largeur L des pistes sur la somme de largeur des pistes et la distance inter-spire ($L+S$).

La Figure 4 - 6B représente la variation du module maximal de la densité de champ magnétique B_{\max} de la bobine générée à $z = 10 \mu\text{m}$ en fonction du taux de remplissage pour différentes largeurs L et le nombre de tours N . B_{\max} augmente avec le taux de remplissage. Les taux de remplissage obtenus vont de 20 à 75% pour différentes géométries de bobines. B_{\max} est maximal pour un taux de remplissage maximal (75%). Aussi, une des règles de dimensionnement des bobines consistera à les concevoir avec une largeur de spires supérieure à la distance inter-spire : $L \gg S$.

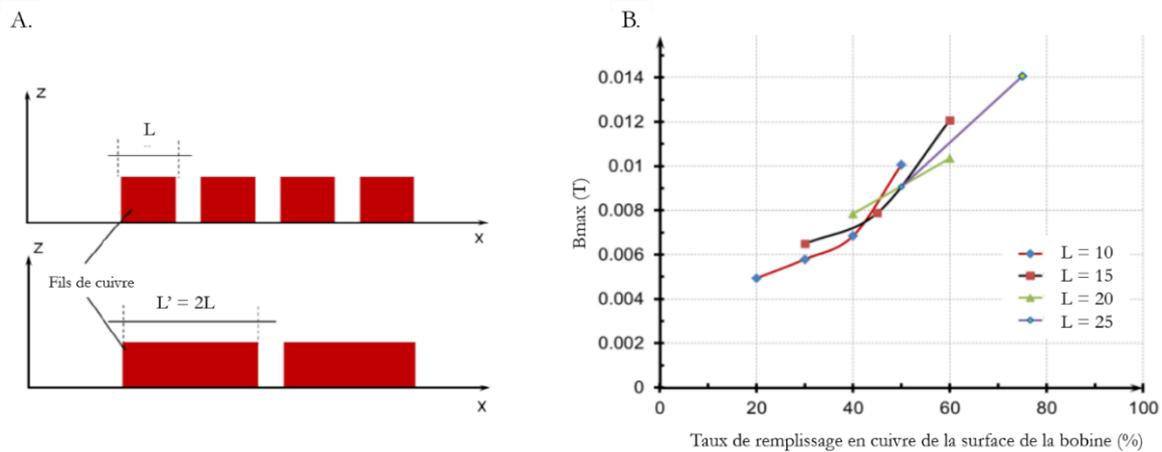


Figure 4 - 6. A. Deux configurations de bobines de même rayon mais de largeur de spires L différentes ; **B.** Influence du taux de remplissage de la bobine sur l'intensité de champ magnétique B_{max} pour une bobine de rayon $R = 500 \mu\text{m}$ (adapté de [1])

Cependant, la Figure 4 - 6B montre également que la valeur maximale de B_{max} n'est pas toujours obtenue pour les pistes les plus larges. Pour $L = 20 \mu\text{m}$, $B_{max} = 10 \text{ mT}$ tandis que pour $L = 15 \mu\text{m}$, $B_{max} = 12 \text{ mT}$, pour un même taux de remplissage (60%). Si les pistes sont trop larges, le centre de la bobine ne peut pas être rempli avec du cuivre. La limite haute du taux de remplissage n'est donc pas atteinte et B_{max} est plus bas que pour une autre configuration qui semblait moins idéale au premier abord.

Ainsi, pour résumer les premières règles de dimensionnement tirées de cette étude géométrique :

- (i) L'épaisseur de PDMS servant à isoler les bobines du canal doit être la plus fine possible car l'intensité du champ magnétique diminue quand la distance entre les bobines et les billes augmente. Cette épaisseur de PDMS peut être fixée à $10 \mu\text{m}$, soit une épaisseur facilement réalisable par enduction centrifuge du PDMS ;
- (ii) La distance inter-spire S est fixée au plus bas de la résolution atteignable par lithographie afin de maximiser le taux de remplissage en cuivre de la bobine : $S = 10 \mu\text{m}$;
- (iii) L'influence de la largeur L des spires devient négligeable sur le profil du champ magnétique pour des distances supérieures à $10 \mu\text{m}$ par rapport à la bobine. En revanche, L doit être supérieure à S pour maximiser le taux de remplissage, donc $L > 10 \mu\text{m}$;
- (iv) L'intensité de champ magnétique augmente avec le nombre de tours N , bien qu'un optimum puisse être atteint pour des nombres de tours inférieurs au maximum. N doit être maximisé au regard des autres paramètres (L et R).

1.1.1.2. Etude des effets thermiques des microbobines

Par ailleurs, comme illustré par les travaux de Fulcrand *et al* [5,6] présentés en introduction de cette partie, l'échauffement des microbobines est également un paramètre important à contrôler. Les pertes par effet Joule P dans la bobine sont données par :

Équation 3

$$P = R \cdot I^2 = V_{Cu} \cdot \rho_{Cu} \cdot J^2$$

où I est l'intensité du courant circulant dans la bobine, R la résistance de la bobine, J la densité de courant, ρ_{Cu} la résistivité du cuivre et V_{Cu} le volume total de cuivre.

La Figure 4 - 7 montre la variation de la puissance dissipée par effet Joule dans la bobine en fonction du nombre de tours N et de la largeur des spires L . Nous pouvons observer que augmenter le nombre de tours N pour une largeur L fixée (et donc augmenter le taux de remplissage) n'entraîne qu'une faible augmentation de la puissance P dissipée. Ainsi, augmenter N n'aurait que peu d'influence sur l'échauffement de la bobine tout en augmentant la densité de champ magnétique maximale B_{max} atteignable par la bobine.

Enfin, afin de comprendre la relation entre la densité de champ magnétique et la consommation énergétique de la bobine, un facteur de mérite de courant $M_i = B_{max}/I$ et un facteur de mérite de puissance $M_p = B_{max}/P$ peuvent être définis afin de représenter la capacité d'une bobine à produire un champ magnétique pour un courant donné et un échauffement par effet Joule donné.

La Figure 4 - 8A montrant l'évolution du facteur de mérite en courant M_i en fonction du nombre de tours N et de la largeur L des spires de la bobine indique qu'un maximum de densité de champ magnétique est obtenu en maximisant le nombre de tours, c'est-à-dire en ne laissant aucun espace vide au centre de la bobine. Par ailleurs, les courbes indiquent également qu'il est préférable d'avoir des spires plus fines.

La Figure 4 - 8B concernant le facteur de mérite de puissance indique également que la densité de champ magnétique maximale est obtenue pour un plus grand nombre de tours sans grande influence de la largeur des spires.

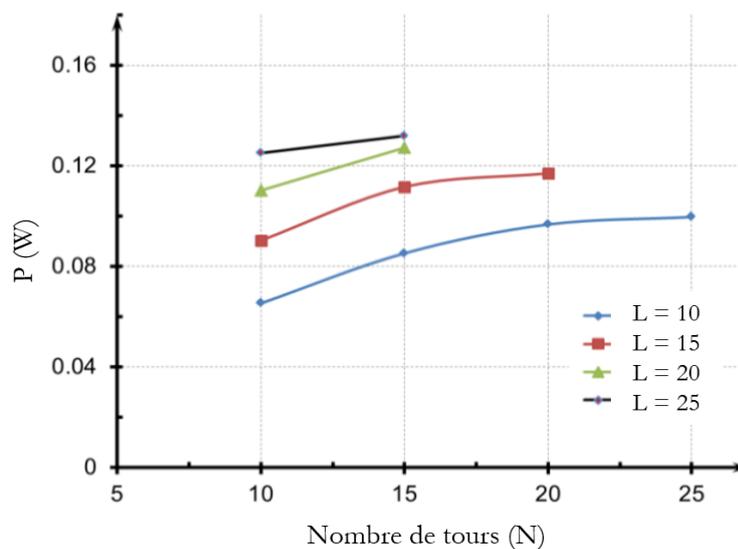


Figure 4 - 7. Variation de la puissance dissipée par effet Joule P en fonction du nombre de tours de la bobine pour différentes largeurs de spires L et un rayon R de $500 \mu\text{m}$ (adapté de [1])

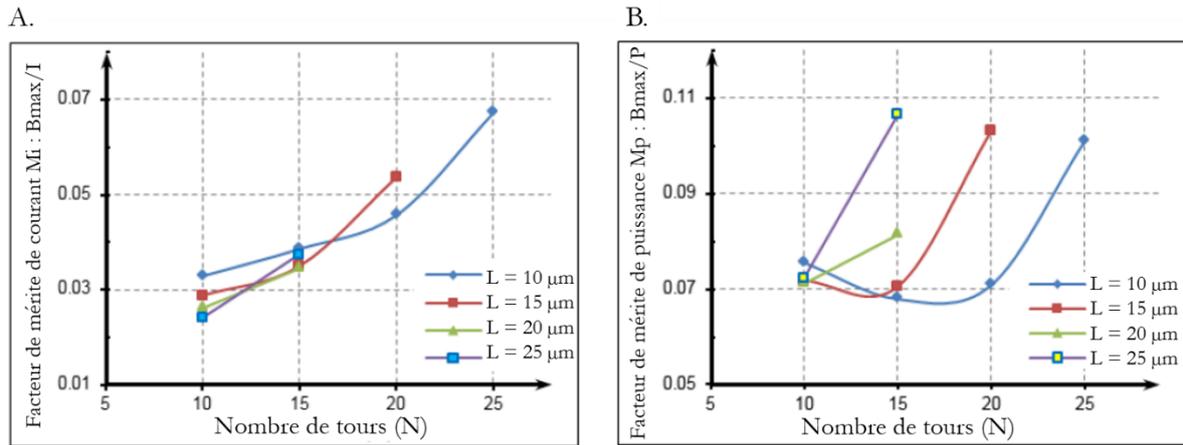


Figure 4 - 8. Évolution des facteurs de mérite de courant M_i et de puissance M_p en fonction du nombre de tours N et de la largeur de spires L pour une bobine de rayon $R = 500 \mu\text{m}$ et distance inter-spire $S = 10 \mu\text{m}$. **A.** Le facteur de mérite en courant M_i est calculé par la densité de champ magnétique maximale obtenue pour chaque unité de courant injecté ; **B.** Le facteur de mérite en puissance M_p est calculé par la densité de champ magnétique maximale obtenue pour chaque unité de puissance dissipée par effet Joule

Ainsi, en prenant en compte les performances énergétiques des bobines, d'autres règles de dimensionnement peuvent être tirées :

- Les bobines doivent être le plus remplies en cuivre : la largeur L des spires doit être fine et le nombre de tours N important pour maximiser la densité de champ magnétique générée par la bobine, sans influence particulière sur l'échauffement par effet Joule ;
- Le centre de la bobine doit être rempli afin de maximiser la densité de champ magnétique tout en minimisant la consommation énergétique et l'échauffement par effet Joule. Cela justifie à nouveau le report de la connexion électrique située au centre de la bobine *via* une sous-piste isolée électriquement du reste de la bobine.

1.1.1.3. Comparaison entre bobines millimétriques et centimétriques

Par ailleurs, une étude menée par Olivier Lefebvre dans ses travaux de thèse au sein de notre département de recherche a porté sur la comparaison de bobines centimétriques (i.e. de rayon extérieur de l'ordre du centimètre) réalisées sur 1 niveau avec les bobines millimétriques sur 3 niveaux de l'étude précédente (voir Figure 4 - 9) [2]. Ces bobines ont été utilisées pour la capture de nanoparticules magnétiques de 300 nm de diamètre. Cette étude a notamment démontré que les bobines millimétriques permettent de capturer les nanoparticules en utilisant des courants plus faibles que pour les bobines centimétriques. De plus, un échauffement plus important a été mesuré sur les bobines centimétriques. Enfin, appliquées à des réactions d'immunosorbtion pour la détection d'ovalbumine, les microbobines millimétriques ont permis d'atteindre une limite de détection en fluorescence inférieure (0.09 nM) que pour les microbobines centimétriques (0.2 nM). Les microbobines millimétriques présentent donc de meilleures performances de capture pour ce type d'application.

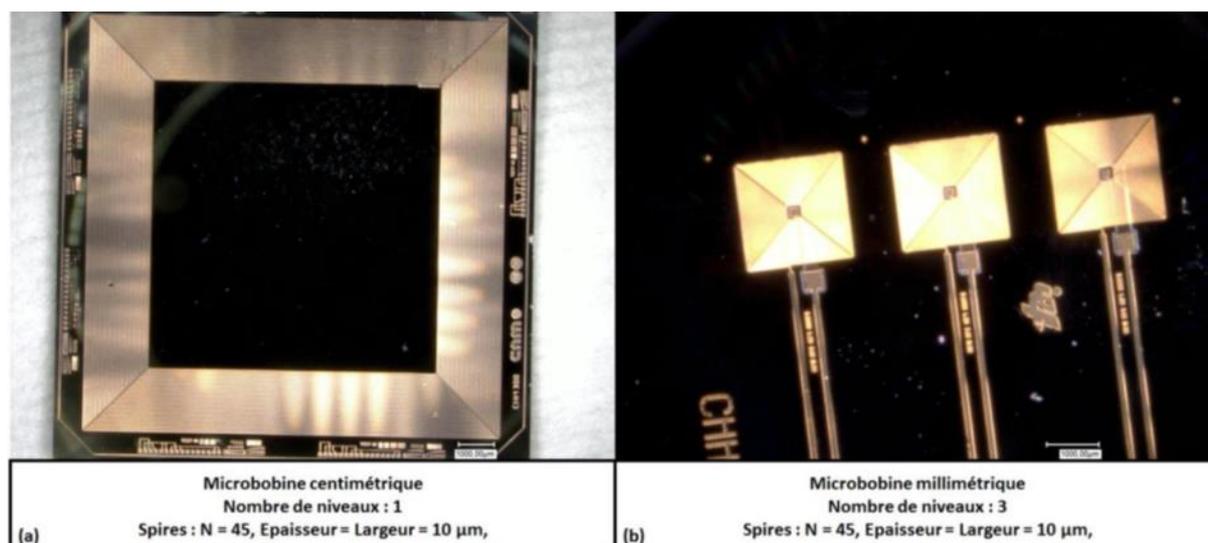


Figure 4 - 9. Photographies des bobines centimétriques (a) et millimétriques (b) réalisées par O. Lefebvre [2]

Ainsi, ces deux études ont servi à définir des designs de bobines dont les dimensionnements permettraient de générer un gradient de champ magnétique assurant un environnement de capture optimale pour différentes tailles de billes magnétiques. Le Tableau 4 - 1 résume les règles de dimensionnements des études de simulation et de comparaison entre les bobines centimétriques et millimétriques.

A partir de ces règles, des masques de lithographie ont été réalisés pour la fabrication des masques de lithographie nécessaires aux différentes étapes de microfabrication des bobines. Le Tableau 4 - 2 présente les différents lots de bobines intégrées au masque selon les paramètres géométriques évalués. La variété de dispositifs présents sur les masques de lithographie permet donc d'évaluer plusieurs conditions de confinement du champ magnétique en fonction de la géométrie des bobines. Cela offre ainsi suffisamment de souplesse par rapport au choix des billes magnétiques utilisées dont les propriétés peuvent modifier les conditions de capture.

Tableau 4 - 1. Résumé des règles de dimensionnement des microbobines

Paramètres de dimensionnement	Règles issues des études de dimensionnement
<i>Epaisseur de PDMS de protection des bobines</i>	La plus fine possible, $z = 10 \mu\text{m}$
<i>Distance inter-spire S</i>	Limite de résolution de lithographie, $S = 10 \mu\text{m}$
<i>Largeur L des spires</i>	Fin mais supérieur à S ; $10 \mu\text{m} < L < 30 \mu\text{m}$
<i>Nombre de tours N</i>	Le plus grand possible en fonction des autres paramètres ; $15 < N < 50$
<i>Rayon des bobines</i>	De l'ordre du millimètre ; $500 < R < 1500 \mu\text{m}$

Tableau 4 - 2. Récapitulatif des géométries de bobines intégrées au masque de fabrication

Paramètres géométrique	Nombre de lots de 3 bobines
$R = 500 \mu m$ $L = 10 \mu m$ $N = 20$	1
$S = 10 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 15$	2
$R = 750 \mu m$ $L = 10 \mu m$ $N = 33$	2
$S = 10 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 25$	1
$L = 20 \mu m$ $N = 20$	1
$R = 1000 \mu m$ $L = 10 \mu m$ $N = 46$	2
$S = 10 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 35$	1
$L = 20 \mu m$ $N = 30$	1
$L = 30 \mu m$ $N = 23$	1
Total	12

Ainsi, en fonction des dimensionnements de bobines, différentes performances magnétiques et énergétiques pourront être obtenues. Dans notre cas, il s'agira de déterminer si ces bobines peuvent être exploitées pour notre application, à savoir la manipulation et la capture de billes magnétiques protéine G de $1 \mu m$ (voir Chapitre 3) pour le greffage d'anticorps en vue de l'immunocapture du TNF- α au sein de la chambre microfluidique.

1.2. Présentation générale du procédé de fabrication

Dans cette partie, nous détaillerons le processus de fabrication des microbobines de cuivre pour la manipulation des billes magnétiques au sein du canal microfluidique. Ces bobines sont réalisées sur substrat de silicium selon différents procédés de microfabrication en salle blanche.

Le dispositif comporte trois niveaux (voir Figure 4 - 10) :

- (i) Une sous-piste de cuivre permettant de connecter le centre de la bobine au circuit extérieur ;
- (ii) Une couche de diélectrique permettant d'isoler la sous-piste des spires de cuivre sur le niveau supérieur ;
- (iii) Des spires de fils de cuivre avec les connectiques pour l'alimentation électrique des bobines.

Pour cette partie de la thèse, une première étape des travaux a porté sur la réalisation de plusieurs lots de microbobines avec des géométries variables sur un substrat de silicium. Plusieurs procédés ont été modifiés et optimisés par rapport au protocole initial proposé dans les travaux de thèse précédent [1].

Puis, une seconde partie des travaux a porté sur la réalisation d'un système de capture amélioré comportant un substrat de $Fe_{20}Ni_{80}$ (Permalloy). L'ajout de ce matériau magnétique doux permettrait de canaliser les lignes de champ magnétique et de confiner la capture, comme illustré par les exemples de la littérature dans la partie 3 du chapitre 1. Cela faciliterait la manipulation des billes magnétiques en injectant des courants moins importants, minimisant l'échauffement des pistes par effet Joule.

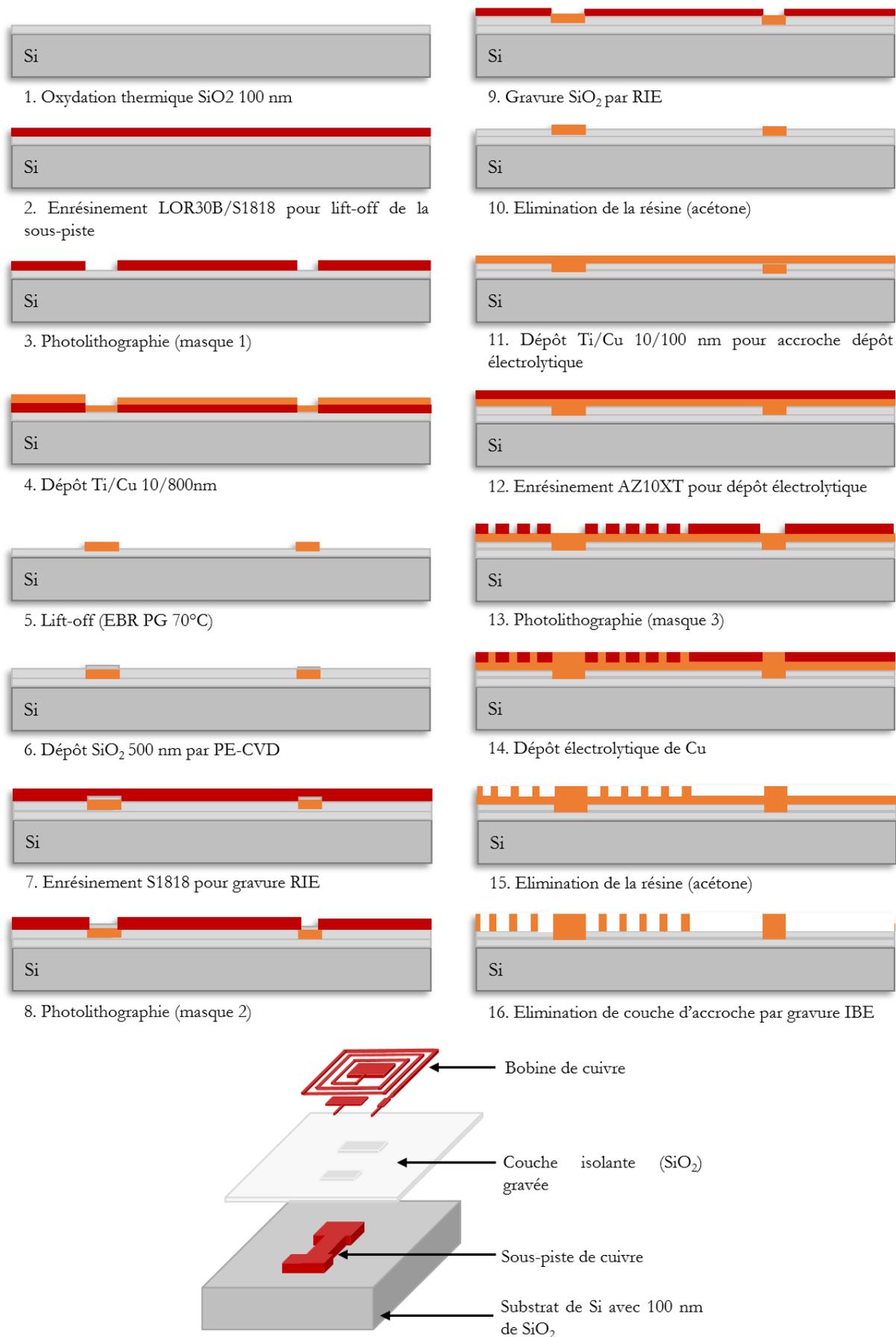


Figure 4 - 10. Procédé de fabrication des microbobines de Cu

Les masques de lithographie pour la fabrication de bobines ont été réalisés durant la thèse de Ha Hong Cao [1]. Ce masque contient 12 lots de microbobines de géométries différentes réparties comme détaillé dans le Tableau 4 - 2 précédent. Chaque lot comporte trois bobines identiques arrangées côte à côte. La répartition des lots sur le masque de lithographie est présentée sur la Figure 4 - 11. Les masques de lithographie ont été fabriqués sur du verre Soda-Lime avec des motifs en chrome (TOPPAN PHOTOMASK, Inc.). Une photographie de quelques bobines fabriquées à partir de ce masque est présentée sur la Figure 4 - 12 avec différentes géométries.

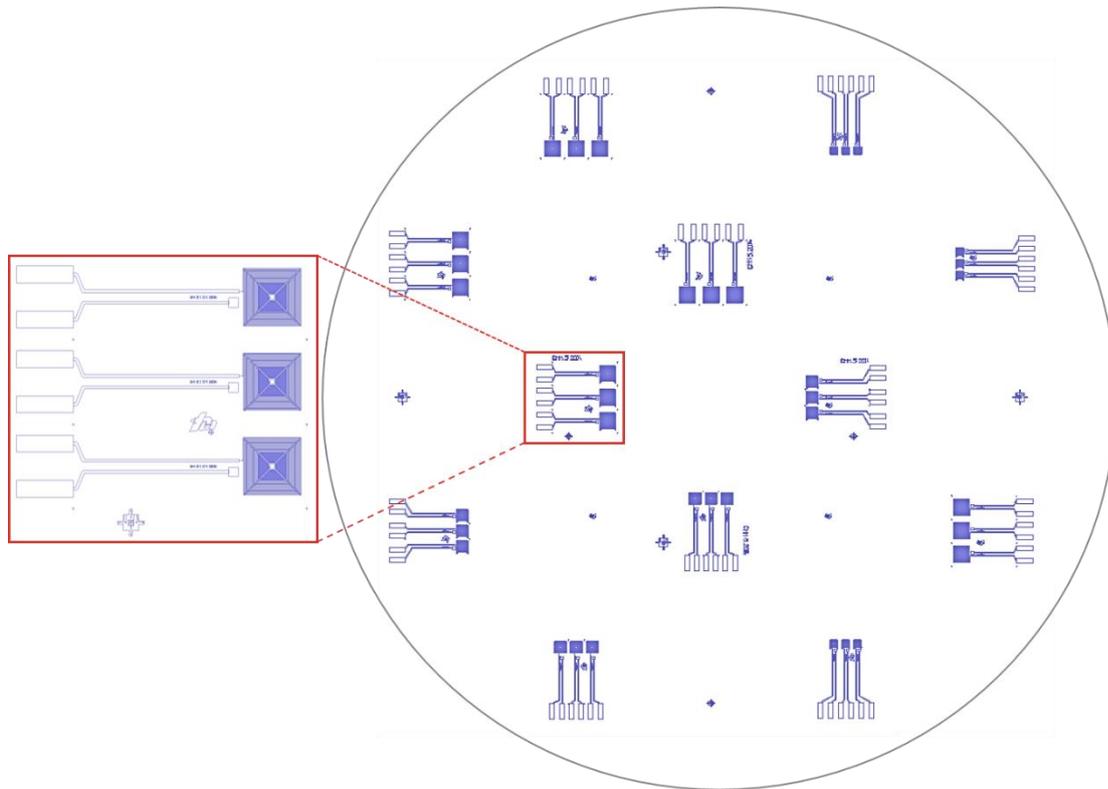


Figure 4 - 11. Répartition des lots de bobines sur le masque de lithographie pour un substrat de silicium de 4 pouces

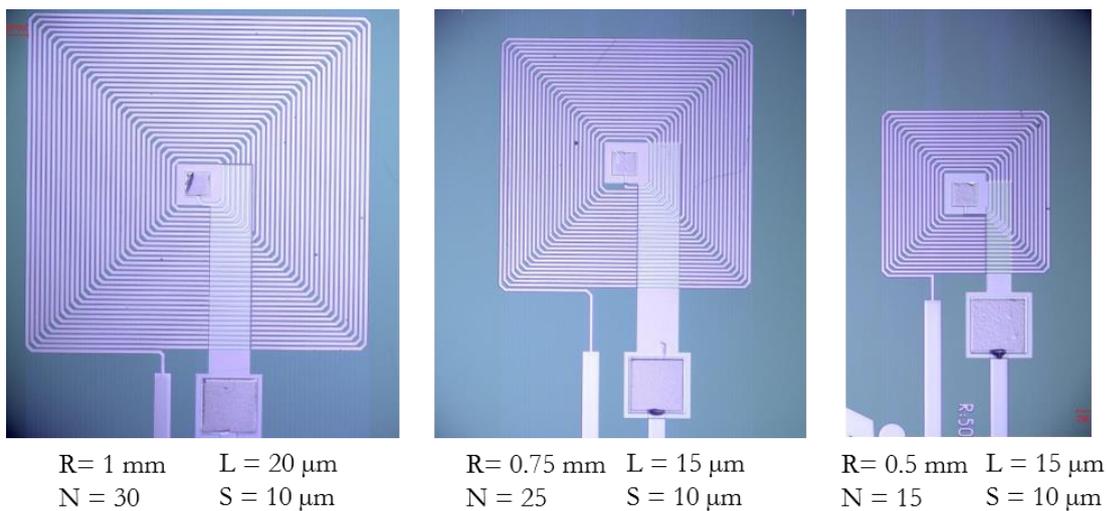


Figure 4 - 12. Exemples des géométries de bobines réalisées. R, rayon des bobines ; S, largeur des spires ; N, nombre de spires ; I, distance inter-spire

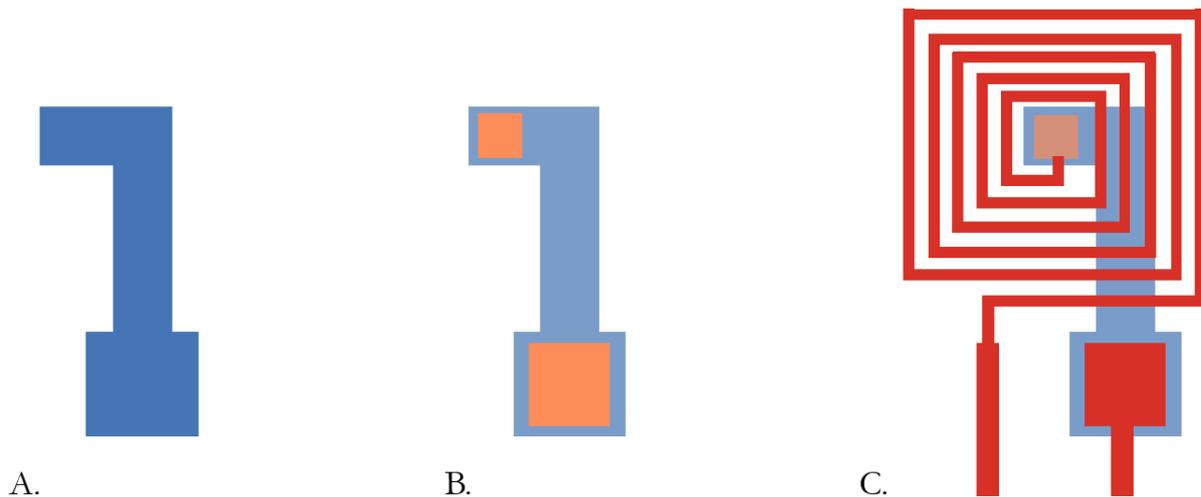


Figure 4 - 13. Schéma des motifs figurant sur les 3 masques de lithographie pour la fabrication des microbobines : **A.** 1^{er} masque correspondant aux sous-pistes de cuivre ; **B.** 2^{ème} masque correspondant aux ouvertures dans la couche isolante de SiO_2 ; **C.** 3^{ème} masque correspondant aux motifs des bobines.

Au total, trois masques ont été réalisés correspondant aux trois niveaux d'empilements pour la réalisation des bobines :

- (i) Le premier masque correspond aux sous-pistes de cuivre permettant le contact entre le centre de la bobine et le circuit extérieur (Figure 4 - 13A) ;
- (ii) Le deuxième masque correspond à l'ouverture par gravure de la couche isolante en SiO_2 permettant de séparer les sous-pistes des motifs de bobines supérieures (Figure 4 - 13B) ;
- (iii) Le troisième masque correspond aux motifs de bobines présentées précédemment (Figure 4 - 13C).

Nous allons voir les différentes étapes de fabrication des bobines sur substrat de silicium, de la préparation du substrat jusqu'à l'intégration des bobines au sein du circuit microfluidique. L'ensemble des bobines présentées sur le masque de la Figure 4 - 11 sont fabriquées selon ce procédé. Les détails et les paramètres de chaque étape technologique sont présentés en annexe.

1.2.1. Préparation du substrat de silicium

Les dispositifs sont réalisés sur des substrats de silicium (100) de diamètre 4 pouces, afin de permettre la réalisation de douze lots de bobines en parallèle.

Le substrat est initialement nettoyé au mélange Piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 4:1) pour retirer toute contamination organique de la surface et offrir un substrat initial stable et répétable pour les étapes ultérieures.

Une couche de silice thermique est ensuite déposée par oxydation humide dans un four à 1050°C afin de produire une couche de 100 nm permettant d'isoler électriquement la surface et éviter des fuites de courant au sein du dispositif. Ce type de substrat peut ensuite être conservé pendant plusieurs mois sans altération.

1.2.2. Premier niveau : la sous-piste de cuivre

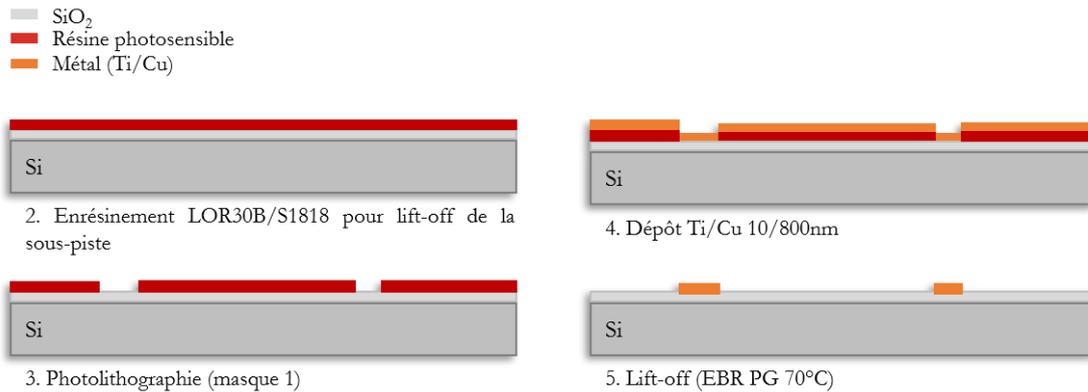


Figure 4 - 14. Étapes de fabrication de la sous-piste de cuivre

Les simulations réalisées par Ha Hong Cao et détaillées dans la partie 1.1 de ce chapitre ont montré la nécessité de remplir le centre des bobines par du cuivre [1]. Aussi, cela implique donc d'intégrer une connexion au centre des spires, nécessitant un report du contact vers l'extérieur du solénoïde. La taille de ces sous-pistes a été déterminée afin de correspondre à la largeur des canaux fluidiques. Leur épaisseur a également été calculée afin de garantir une épaisseur suffisante pour supporter une densité de courant importante sans pour autant créer de décalage conséquent du niveau des bobines avec le reste du substrat (voir Figure 4 - 15A). En effet, une sous-piste trop épaisse soulèverait localement les spires, pouvant entraîner une rupture du solénoïde. Aussi, l'épaisseur a été fixée à 800 nm de cuivre. Sur la Figure 4 - 15B nous pouvons observer sur la tranche de la bobine que la continuité des spires est bien assurée malgré le léger décalage occasionné par la sous-piste.

Pour la fabrication des sous-piste de cuivre (Figure 4 - 13.A), un procédé de lift-off est utilisé, comme décrit dans les étapes de la Figure 4 - 14. Pour cela, le substrat est recouvert d'une épaisseur de résine au moins 3 fois supérieure à l'épaisseur de métal déposé. Les motifs de sous-piste sont structurés par lithographie optique et développés. Une couche métallique est déposée puis le substrat est plongé dans un bain d'acétone ou un solvant dans lequel la résine est suffisamment soluble. Les zones métallisées sur la résine se décollent quand celle-ci est dissoute et seuls restent les motifs développés avec l'épaisseur de métal désirée. Généralement, cette étape est réalisée avec un masque négatif des motifs afin d'utiliser une résine inversible. Ces résines permettent d'obtenir des profils de motifs avec des flancs inclinés vers l'extérieur du motif, offrant un effet de « visière » lors du dépôt métallique. Cette visière facilite le lift-off et limite les effets de bords ainsi que le risque de décollement de certains motifs (voir Figure 4 - 16).

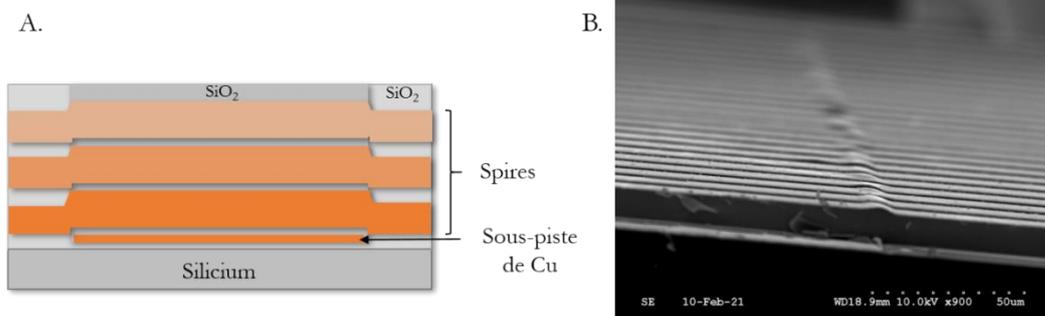


Figure 4 - 15. **A.** Schéma en tranche du décalage occasionné par la sous-piste au niveau des spires de la bobine ; **B.** Photographie MEB de la tranche d'une bobine au niveau de la sous-piste

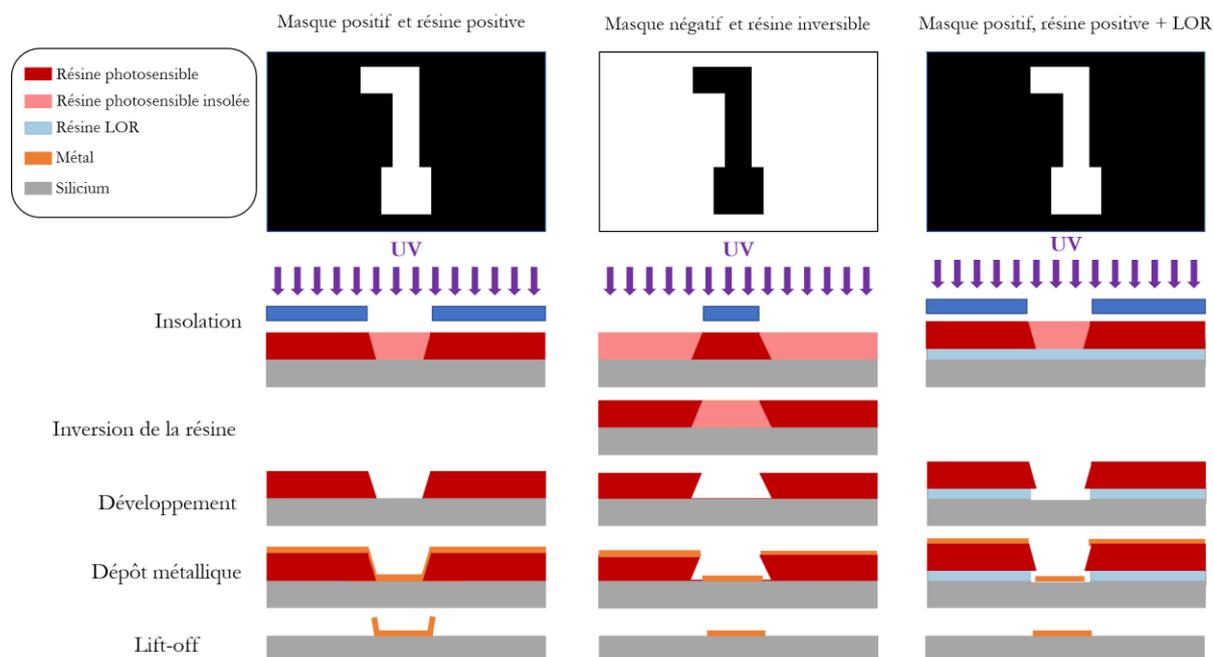


Figure 4 - 16. Stratégies de lift-off avec masques positif/négatif, résine positive/inversible et résine LOR

Dans notre cas, afin de favoriser l'adhérence du cuivre sur la silice et limiter la diffusion de ce dernier dans le diélectrique, une couche de 10 nm de titane est déposée avant le cuivre à une vitesse de 2 nm/s ($P=1,5 \cdot 10^{-7}$ mbar) [7]. Une épaisseur de 800 nm de cuivre est déposée à une vitesse de 1 nm/s ($P=8,0 \cdot 10^{-8}$ mbar). Les deux couches métalliques sont réalisées par évaporation sous vide par canon à électrons (PLASSYS MEB400).

La Figure 4 - 17 montre une photographie au microscope à balayage électronique (MEB) de la tranche du substrat comprenant la couche de 100 nm silice thermique déposée sur le silicium puis une couche de 10nm de Ti et 100 nm Cu. Les dimensions sont bien en accord avec les épaisseurs souhaitées, à savoir 100nm de SiO_2 et 10 nm de Ti + 100 nm de Cu. La couche de titane intermédiaire n'est pas visible ici avec cette résolution. De plus, le clivage de l'échantillon provoque généralement un débordement des métaux mous comme le cuivre sur la tranche du substrat ; ce qui a pour conséquence de masquer les couches les plus fines sous-jacentes lors de l'observation.

Le masque utilisé et réalisé par Ha Hong Cao [1] est un masque positif, ce qui occasionne des effets de bords, formant des pointes sur les flancs du motif (voir Figure 4 - 16). Ces pointes peuvent par la suite traverser la couche de silice isolante déposée à l'étape suivante et créer une fuite de courant. Sur la Figure 4 - 18 A et C nous observons bien les effets de bords produits par un lift-off effectué dans ces conditions avec une résine positive (MICROPOSIT S1818) à 2.5 μm . Les pointes peuvent atteindre près de trois fois l'épaisseur de la sous-piste : 4.5 μm sont mesurés au niveau des pointes au profilomètre mécanique. Pour minimiser ces effets de bords, Ha Hong Cao a plongé le substrat dans une solution de gravure du cuivre (Cu Etch) pendant quelques secondes afin de réduire les pointes. Cependant, une gravure mal maîtrisée peut vite conduire à une sur-gravure de la sous-piste ou une inégalité des motifs le long du wafer en cas de gravure inhomogène. De plus, les risques de décollement des motifs (Figure 4 - 18B) sont toujours possibles.

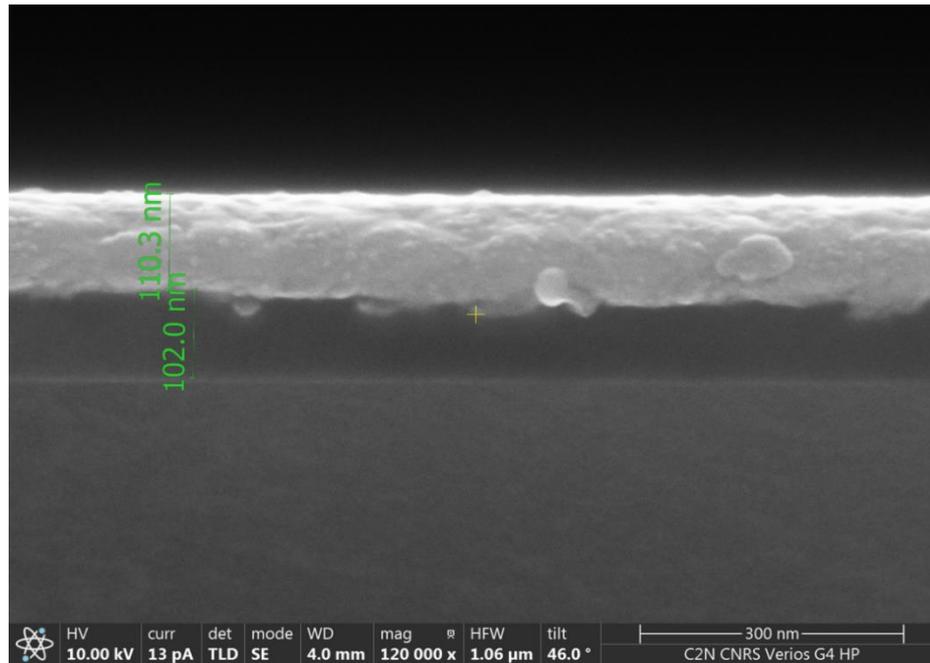


Figure 4 - 17. Photographie MEB de la tranche du dépôt de Ti/Cu sur le substrat de silicium oxydé (100 nm de SiO₂)

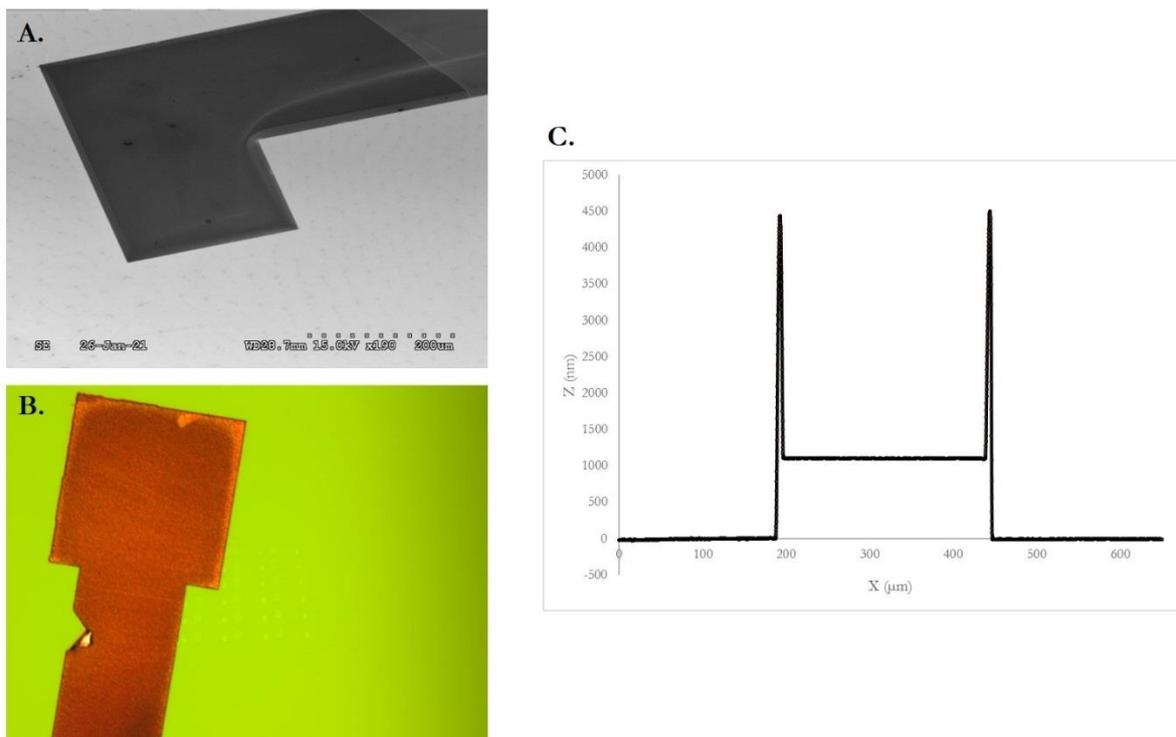


Figure 4 - 18. Les défauts du lift-off : **A.** Photographie au microscope électronique à balayage de la sous-piste de cuivre, tilt 45° ; **B.** Photographie au microscope optique d'un décollage de la sous-piste suite au lift-off ; **C.** Profil mesuré au profilomètre mécanique de la sous-piste avec effets de bords

Une autre approche a été développée pour permettre d'obtenir un lift-off de meilleure qualité, sans effet de bords et sans risque de décollement des motifs, tout en conservant le même masque. Pour cela, une sous-couche est réalisée à partir d'une résine non photosensible (LOR 30B, Microchem) sous la couche de résine photosensible positive. Cette sous-couche est soluble dans les mêmes développeurs que la résine supérieure. Il s'agit alors de développer les motifs insolés dans la résine photosensible puis de laisser le développeur dissoudre la sous-couche à l'endroit des motifs jusqu'à créer une « visière » (voir Figure 4 - 16). L'angle des flancs de cette visière est défini par les conditions de recuit de la sous-couche. Plus le temps de recuit est important, plus les flancs sont inclinés. Cela empêche la formation d'effets de bords sur le motif métallique. Nous pouvons ainsi voir sur la Figure 4 - 19B une photographie de la lithographie des deux couches de résine, que la sous-couche est légèrement plus développée que la résine photosensible. Cela se manifeste par un léger liseré autour des limites du motif, témoignant bien d'un retrait de la sous-couche par rapport au motif. Ce retrait garantit l'effet de « visière » souhaité.

Le lift-off est réalisé dans un solvant (EBR PG) à 70 °C permettant de dissoudre la sous-couche et la résine afin de décoller les couches métalliques. Nous observons bien sur la Figure 4 - 19C le profil de la sous-piste de cuivre avec des flancs bien droits et une surface plane sans défaut, garantissant l'intégrité de la couche de diélectrique déposée à l'étape suivante. Par ailleurs, aucun décollement des motifs métalliques n'est observé avec ce procédé.

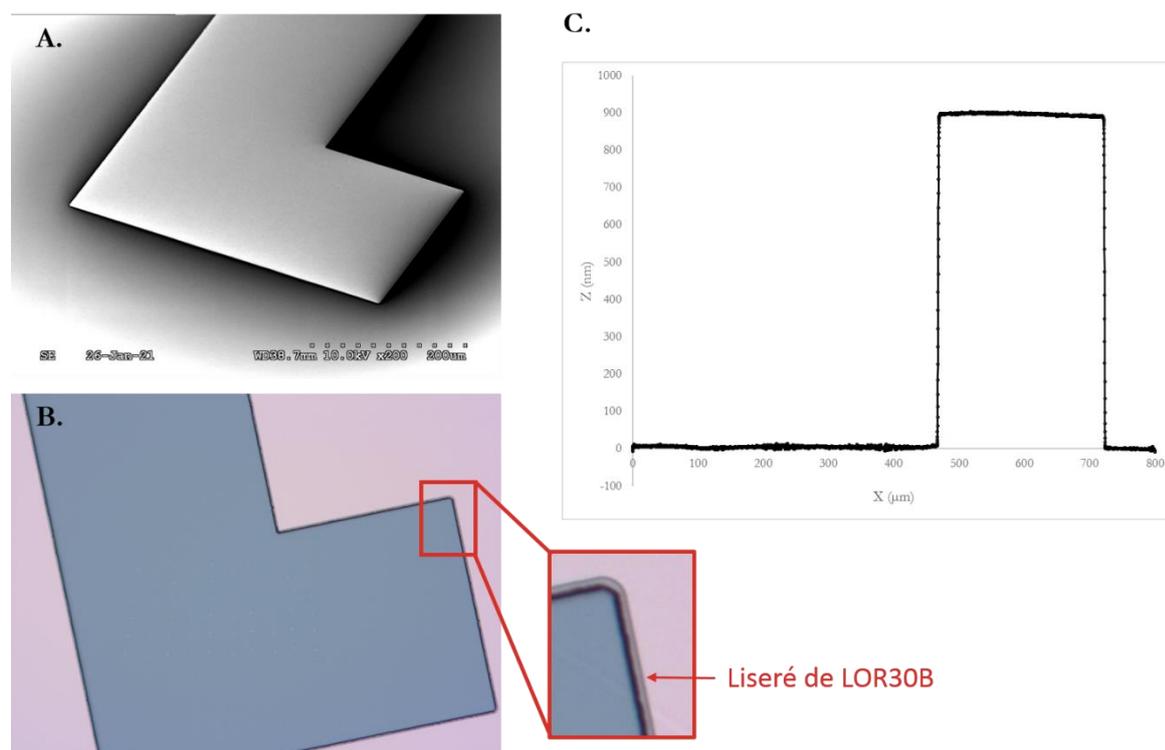


Figure 4 - 19. Lift-off avec utilisation d'une sous-couche de LOR 30B. **A.** Photographie au microscope électronique à balayage de la sous-piste de cuivre, tilt 45° ; **B.** Photographie au microscope optique des motifs après lithographie et avant dépôt métallique avec le liseré de résine LOR ; **C.** Profil mesuré au profilomètre mécanique de la sous-piste sans effet de bords

L'épaisseur mesurée ici est de $896,6 \pm 10,2$ nm pour un motif situé au centre du wafer. Pour les motifs situés au bord du substrat, l'épaisseur mesurée est de $853 \pm 18,3$ nm. Cette différence d'épaisseurs entre le centre et le bord du substrat peut s'expliquer par de légères inhomogénéités lors de la répartition de la résine par enduction centrifuge ainsi que lors du dépôt métallique par évaporation sous vide dans un bâti où l'échantillon n'est pas en rotation. Néanmoins ces différences restent acceptables ($<5\%$ de l'épaisseur visée).

Ainsi, cette première étape de fabrication de la sous-piste de cuivre a été optimisée par rapport au protocole précédent [1]. Le bon développement des motifs est assuré en améliorant les conditions de lift-off ; de même les profils présentent bien des flancs droits sans effet de bord. Les défauts préalablement observés sont ainsi évités et l'isolation électrique de la sous-piste lors l'étape suivante ne présente plus de risque de court-circuit. L'intégrité de la sous-piste est en effet essentielle pour assurer la bonne conduction du courant au travers de la bobine.

1.2.3. Deuxième niveau : isolation de la sous-piste

Comme expliqué précédemment, la sous-piste permet le contact entre le centre de la bobine et le report de connexion vers le circuit extérieur. Cette sous-piste doit donc être isolée électriquement de la spire de cuivre située dans les niveaux supérieurs. Afin d'isoler électriquement les deux niveaux de cuivre (sous-piste et bobine), une couche de SiO_2 est déposée sur le substrat par PE-CVD (voir Figure 4 - 20). Une épaisseur de 500 nm de silice est nécessaire pour assurer une bonne isolation des deux niveaux.

L'isolation du substrat est vérifiée par un système de mesure électrique 4 pointes. Pour cela une rampe de courant est appliquée sur l'échantillon entre 3 et 9 mA avec un pas de 1 mA à une tension de 100V. Une valeur infinie de la résistivité du substrat a été mesurée, confirmant la bonne isolation des deux couches.

Puis, pour permettre le contact électrique au niveau du centre de la bobine et du report de connexion extérieure, la silice est gravée aux extrémités de la sous-piste de cuivre précédente. Pour cela, une couche de résine (S1818) est déposée sur le substrat et un masque de lithographie intégrant les ouvertures au niveau des sous-pistes est utilisé pour structurer la résine et permettre une gravure sélective de la silice par RIE. La résine est ensuite éliminée dans un bain d'acétone. La Figure 4 - 21 présente les motifs d'ouverture dans la couche de silice avec le profil obtenu après gravure au niveau de la sous-piste.

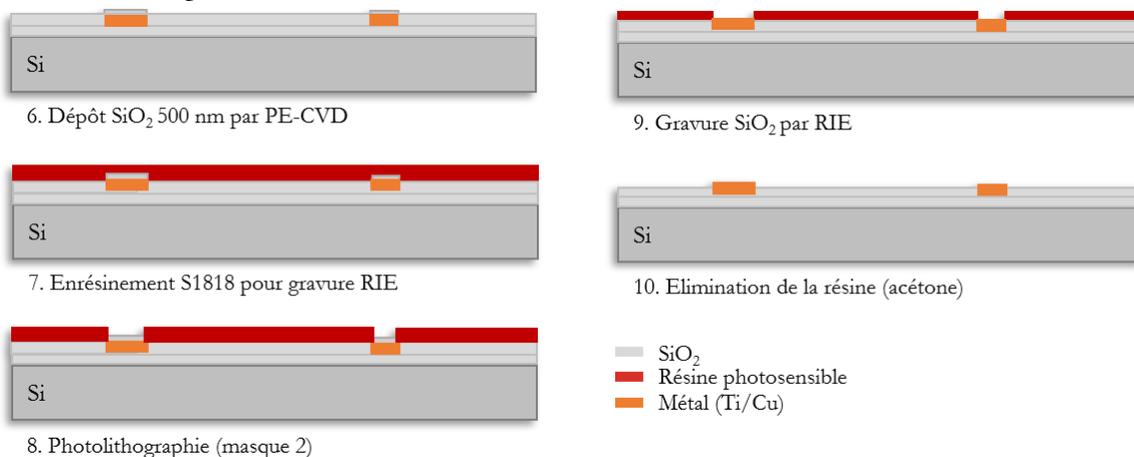


Figure 4 - 20. Étapes d'isolation de la sous-piste de cuivre et de gravure de la couche isolante

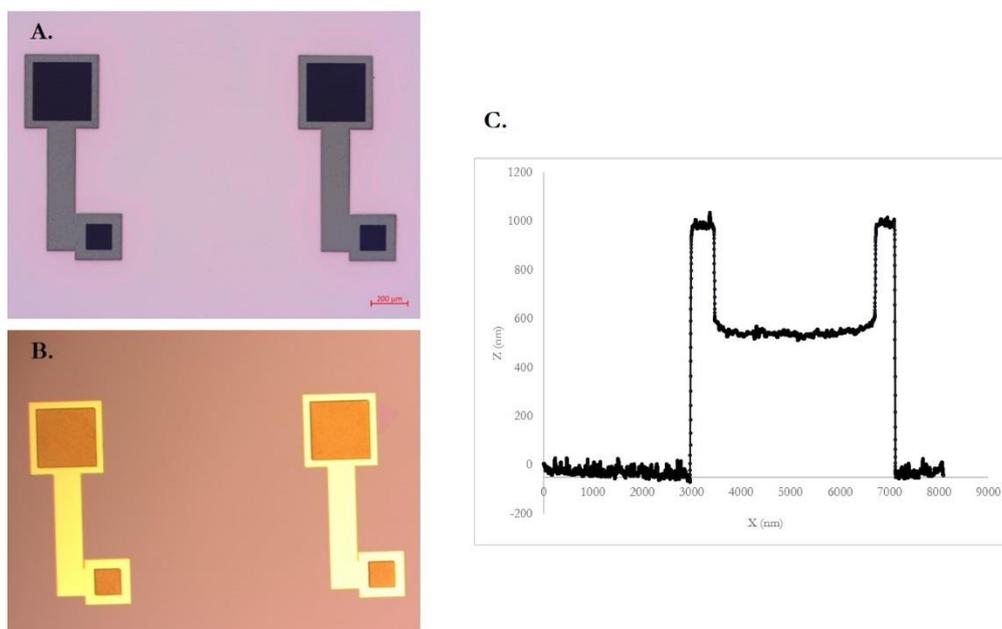


Figure 4 - 21. Ouverture de la couche isolante de SiO_2 sur les sous-pistes de cuivre par RIE. A. Photographie au microscope optique des motifs de gravure après lithographie B. Photographie au microscope optique des motifs après gravure et élimination de la résine ; C. Profil mesuré au profilomètre mécanique de la sous-piste au niveau de la zone gravée après élimination de la résine

La Figure 4 - 22 montre les images en microscopie électronique à balayage des sous-pistes gravées. Nous pouvons noter une bonne définition des zones gravées. L'analyse EDX indique que la zone ouverte est bien constituée uniquement de cuivre (96.7%) et de titane (2.5%). Des mesures EDX sur la sous-piste avant le dépôt de silice indiquait des proportions de 93.8% de Cu, 3.16% de Ti et 3.05% d'oxygène. Les faibles pourcentages d'oxygène (0.8% et 3.05%) correspondent à une légère oxydation du cuivre en surface. Aussi, sans tenir compte de la couche d'oxyde, la composition de la sous-piste est bien retrouvée après gravure.

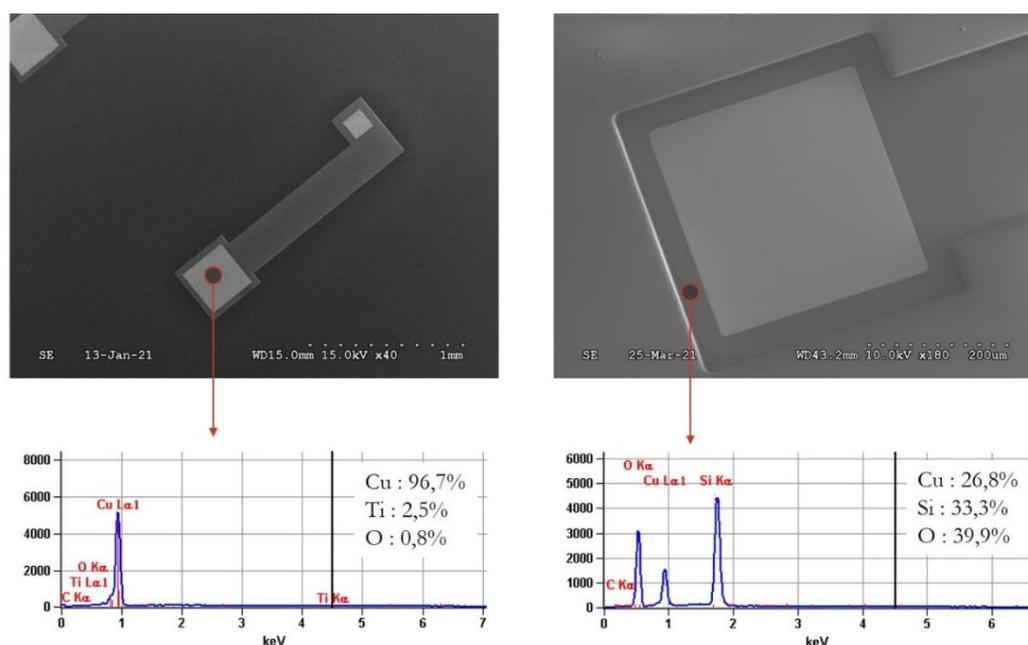


Figure 4 - 22. Images au microscope électronique à balayage des sous-pistes de cuivre avec silice gravée et analyse EDX des zones gravées et non gravées

Une analyse des zones non gravées sur la figure de droite montre que la composition varie avec davantage de silicium (33.3%) et d'oxygène (39.9%), représentant la composition de la silice. La stœchiométrie de la silice (SiO_2) ici n'est pas vérifiée car la présence du cuivre sous-jacent modifie les proportions relatives des atomes.

La bonne isolation des pistes ainsi que le contact au niveau des extrémités des sous-pistes étant assurés, il est maintenant possible de faire croître les bobines de cuivre par dépôt électrolytique.

1.2.4. Troisième niveau : croissance des bobines de cuivre

Afin de permettre la croissance des motifs de bobines par dépôt électrolytique de cuivre, une couche d'accroche métallique doit être déposée sur le substrat pour le rendre conducteur (voir Figure 4 - 23). Ainsi 10 nm de titane et 100 nm sont déposés par évaporation sous vide et assurent la continuité électrique entre la sous-piste de cuivre et le niveau supérieur au niveau des zones gravées dans couche de silice intermédiaire. La couche de titane permet une meilleure adhésion du cuivre sur la silice et limite la diffusion du cuivre dans la couche de silice qui risquerait d'occasionner des fuites de courant entre les 2 niveaux [7].

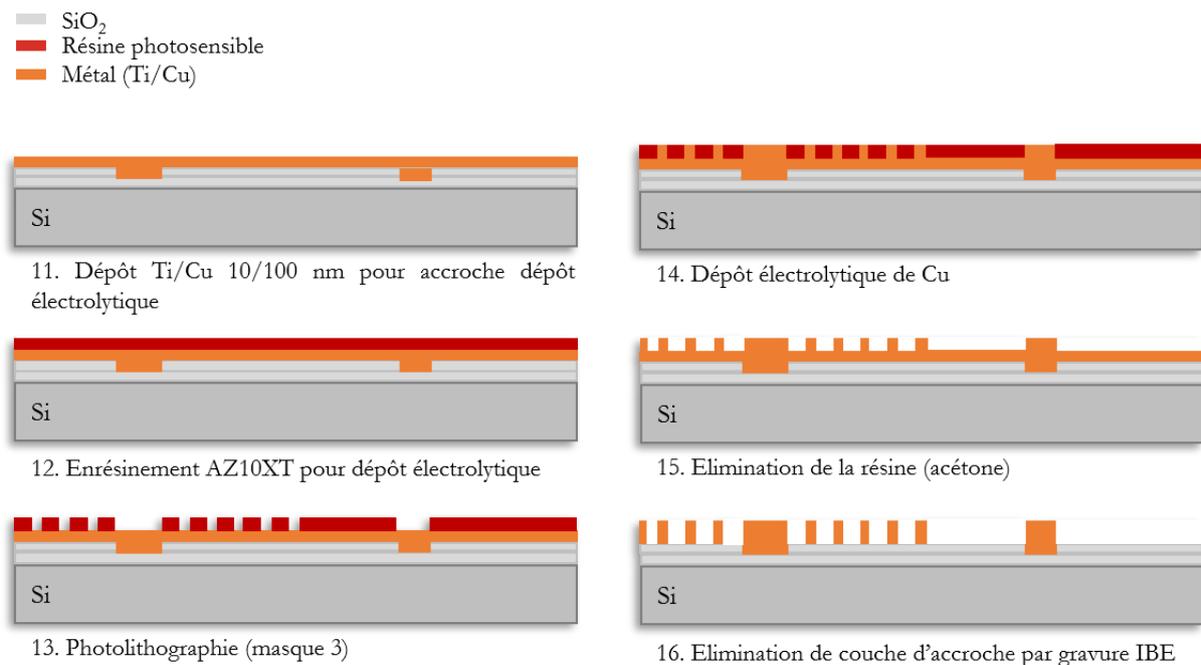


Figure 4 - 23. Etapes de micromouillage des bobines de cuivre

La croissance des spires des microbobines est réalisée par dépôt électrolytique de cuivre. Pour cela, une technique de micromouillage est utilisée en déposant une couche de résine photosensible structurée ensuite par photolithographie à l'aide du masque comportant les motifs de microbobines. Traditionnellement, la résine AZ4562 (Microchem) était utilisée pour cette étape et avait été mise au point pour obtenir des épaisseurs de résine de 20 μm permettant une bonne définition des motifs les plus fins des bobines (10 μm de large). Cependant, durant cette thèse, l'environnement du laboratoire a été modifié à la suite du déménagement dans de nouveaux locaux. Les conditions hygrométriques en salle blanche montrant des instabilités, les paramètres précédemment utilisés ne permettaient pas d'obtenir la résolution suffisante. Les flancs des motifs n'étaient pas suffisamment définis et les bobines obtenues n'étaient pas fonctionnelles.

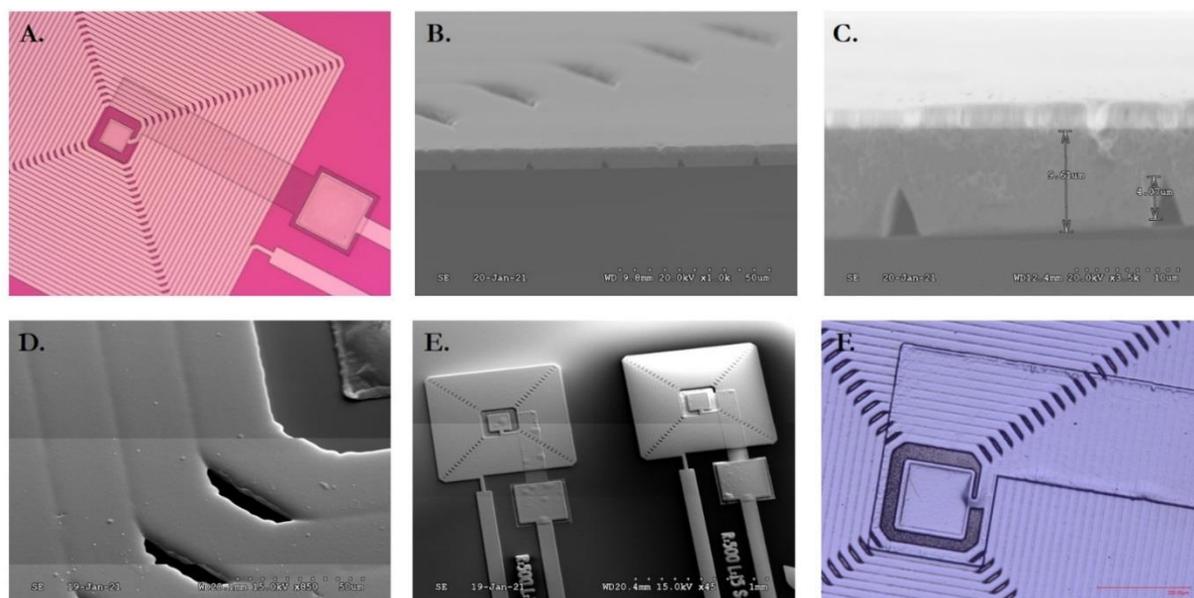


Figure 4 - 24. Défauts de la photolithographie des bobines sur la résine AZ4562 : **A.** Image au microscope optique des motifs après lithographie de la résine ; **B-E.** Images au MEB des bobines après dépôt électrolytique et élimination de la résine : **B.** Tranche des bobines **C.** Tranche des bobines avec un grossissement plus important **D.** Aspect des spires au niveau des angles de la bobine. **E.** Aspect général des bobines. **F.** Image au microscope optique des spires de la bobine.

Sur la Figure 4 - 24 nous pouvons observer les différents défauts de résolution obtenus pour cette résine. Les dimensions du masque ne sont pas respectées et les flancs ne sont pas droits (voir Figure 4 - 24C), entraînant une collision des différentes spires après dépôt électrolytique. Plusieurs tentatives d'optimisation des conditions d'enrésinement (monocouche et bicouche de résine), de recuit (recuit lent et long temps de relaxation) et d'insolation/développement n'ont pas permis de retrouver rapidement les performances requises pour assurer l'intégrité des bobines.

Des essais ont alors porté sur une nouvelle résine, plus récente, l'AZ10XT (Microchem), réputée pour sa résolution et sa bonne tenue en solution acide, comme le dépôt électrolytique. La résine AZ10XT étant moins visqueuse que l'AZ4562, des épaisseurs de 15 μm maximum sont atteignables avec des paramètres d'enduction raisonnables (1200 rpm, 30s, 1000 rpm/s). Cette épaisseur est suffisante pour déposer les 10 μm de cuivre pour le micromoulage des bobines de cuivre.

Nous pouvons voir sur la Figure 4 - 25 que cette résine permet d'obtenir des motifs bien mieux résolus, avec conservation des dimensions du masque lors du dépôt. Des mesures effectuées au microscope optique et au MEB (voir Figure 4 - 25E) montrent une distance inter-spire de 9 μm (contre 10 μm sur le masque) et 21 μm de largeur de spire pour 20 μm sur le masque de la bobine mesurée. Une légère diffraction des motifs lors de l'insolation peut expliquer une perte d'environ 500 nm de part et d'autre des motifs du masque résultant en une très légère différence des dimensions de la résine après photolithographie. Les microbobines obtenues sont de meilleure qualité et correctement définies. Aussi, cette résine offre une alternative moins contraignante que l'AZ4562 avec des performances remarquables pour le dépôt électrolytique.

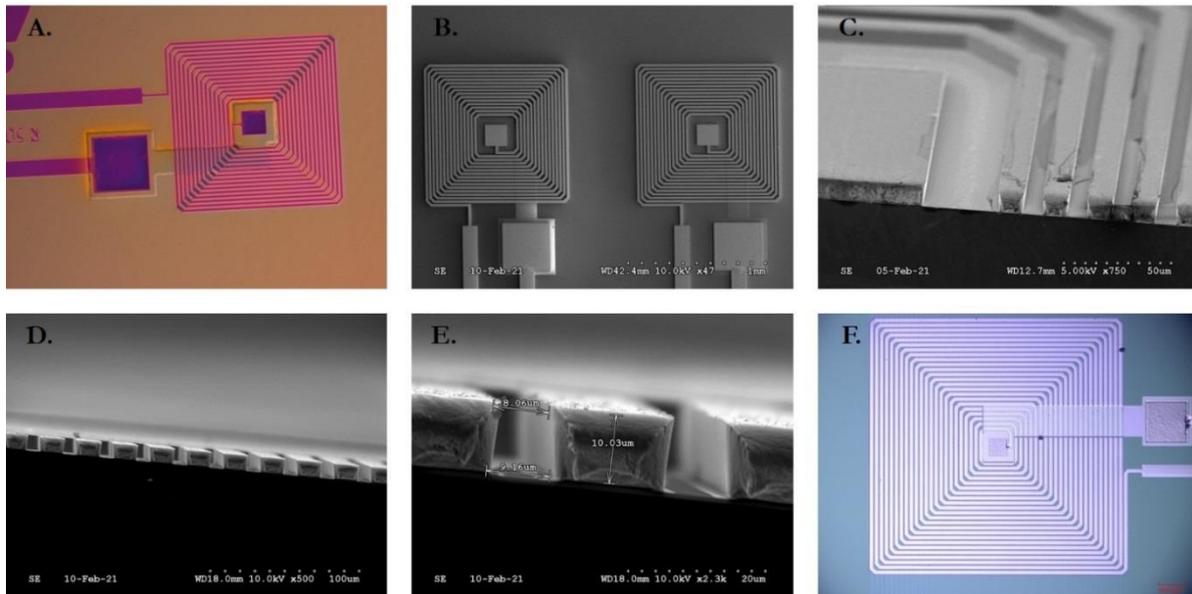
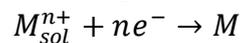


Figure 4 - 25. Micromouldage des bobines de cuivre avec AZ10XT : **A.** Image au microscope optique des motifs après lithographie de la résine ; **B-E.** Images au MEB des bobines après dépôt électrolytique et élimination de la résine : **B.** Aspect général des bobines **C-E.** Tranches des bobines avec un grossissement variable. **F.** Image au microscope optique des spires de la bobine.

Le dépôt de couche épaisse de cuivre est réalisé par l'électrolyse du cuivre en solution (dépôt électrolytique). C'est une technique permettant d'obtenir des dépôts de cuivre épais en un temps raisonnable ($v_{\text{croissance}} \approx 0.5\mu\text{m}/\text{min}$). Ce processus se base sur la transformation de l'énergie électrique en énergie chimique. Pour cela, une réaction d'oxydo-réduction a lieu à l'interface des électrodes.

La cathode est le siège de la réduction des espèces métalliques en solution :



L'anode est le siège de l'oxydation du métal *via* la réaction inverse, où M est le métal, n la quantité d'électrons consommée par la réaction, M_{sol}^{n+} les ions métalliques en solution.

Le montage comporte généralement 3 électrodes : une électrode de travail (la cathode, ou la surface sur laquelle se dépose le cuivre), une contre-électrode (l'anode, en cuivre et servant à régénérer le bain en ions cuivreux consommés à la cathode) et une électrode de référence permettant de mesurer le potentiel de l'électrode de travail. Dans notre cas, le montage est simplifié et n'intègre pas d'électrode de référence (voir Figure 4 - 26).

La croissance du cuivre a lieu sur les surfaces conductrices donc non protégées par la résine. Les électrons acheminés à la cathode réagissent sur ces surfaces exposées avec les ions cuivreux en solution et forment une couche métallique. Il est donc capital d'assurer un état de surface parfaitement propre pour permettre une croissance homogène du cuivre sur les motifs du moule de résine. Pour s'assurer qu'aucun résidu de résine ne reste dans les motifs après développement, le substrat est exposé à un plasma d'oxygène (10W, 30 mTorr, 2min). Cela améliore aussi la mouillabilité de la résine et la pénétration de la solution d'électrolyte à l'intérieur des plus petits motifs. Le contact électrique est assuré en périphérie de l'échantillon par une pince crocodile accrochée à une zone conductrice où la résine a été retirée. La faible résistivité du cuivre et l'épaisseur de la couche d'accroche permettent d'avoir une surface quasi équipotentielle et un dépôt homogène sur la surface.

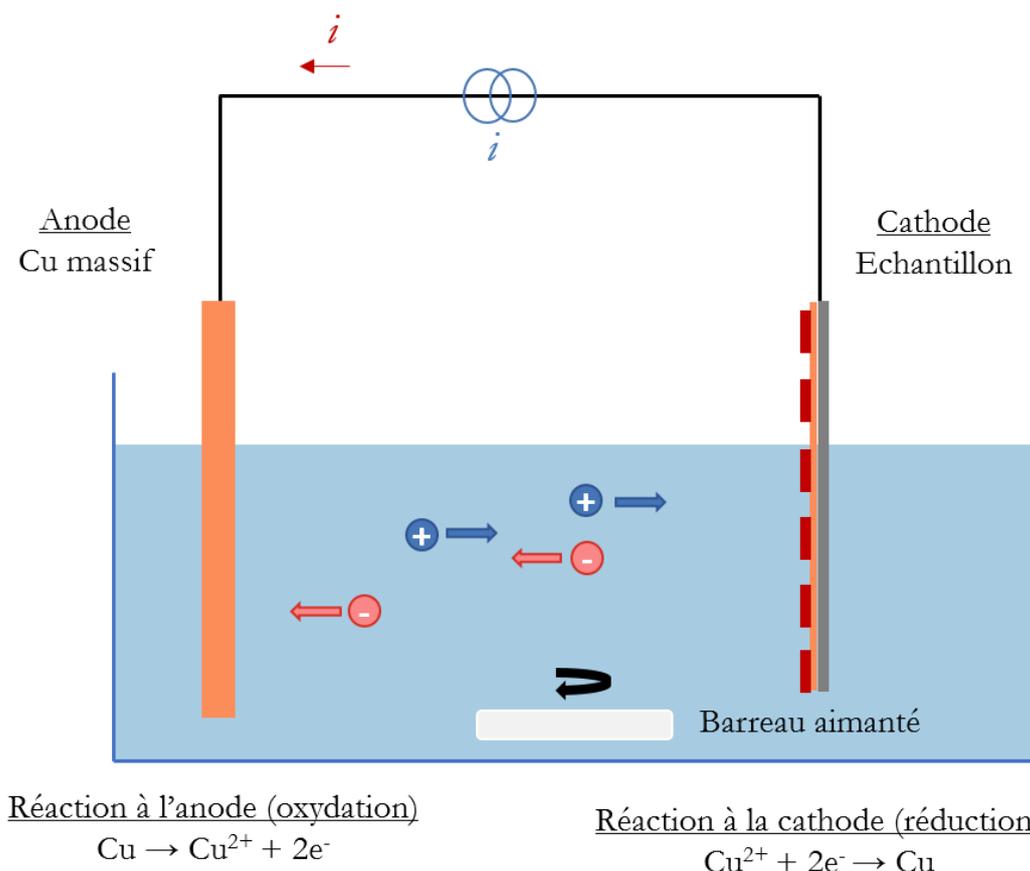


Figure 4 - 26. Principe et montage du dépôt électrolytique de cuivre

Le dispositif expérimental présenté sur la Figure 4 - 26 est composé d'un agitateur magnétique avec un barreau aimanté, d'un récipient suffisamment haut pour accueillir la totalité du substrat à la verticale, de deux électrodes reliées au potentiostat et apposés sur la contre-électrode en cuivre décapée à l'acide juste avant le dépôt et le substrat, d'un bain sulfaté acide composé de CuSO_4 à 75 g/L (0.3M), H_2SO_4 à 200 g/L (2M) et HCl à 50 mg/L (1.3 mM). Un additif de type brillanteur (Electrodeposit 270, Shipley) est ajouté à 5 mL/L de bain avant chaque dépôt.

Le dépôt des 10 μm de cuivre est réalisé en courant continu ($J = -30 \text{ mA/cm}^2$).

Après dépôt, l'épaisseur déposée est vérifiée au profilomètre mécanique (voir Figure 4 - 27). Nous pouvons constater que l'épaisseur déposée varie légèrement d'un bord à l'autre de la bobine. Cet effet est inhérent au dépôt électrolytique et dépend de la répartition des lignes de courant traversant les motifs. Cela crée des zones où le courant est plus intense et la vitesse de dépôt est légèrement plus rapide, occasionnant une petite surépaisseur. Le profil de la bobine est néanmoins conforme aux dimensions souhaitées et les variations d'épaisseurs n'altèrent pas les performances de capture.

La résine est ensuite éliminée dans un bain d'acétone puis la couche d'amorçage de Ti/Cu est éliminée par gravure IBE (Roth & Rau IonSys 500). L'ensemble des paramètres des différentes étapes de fabrication des microbobines sont détaillés en annexe. Quelques géométries de microbobines obtenues sont présentées sur la Figure 4 - 12.

Les étapes de microfabrication sont ainsi terminées. Les microbobines doivent maintenant être conditionnées pour être intégrées au dispositif microfluidique.

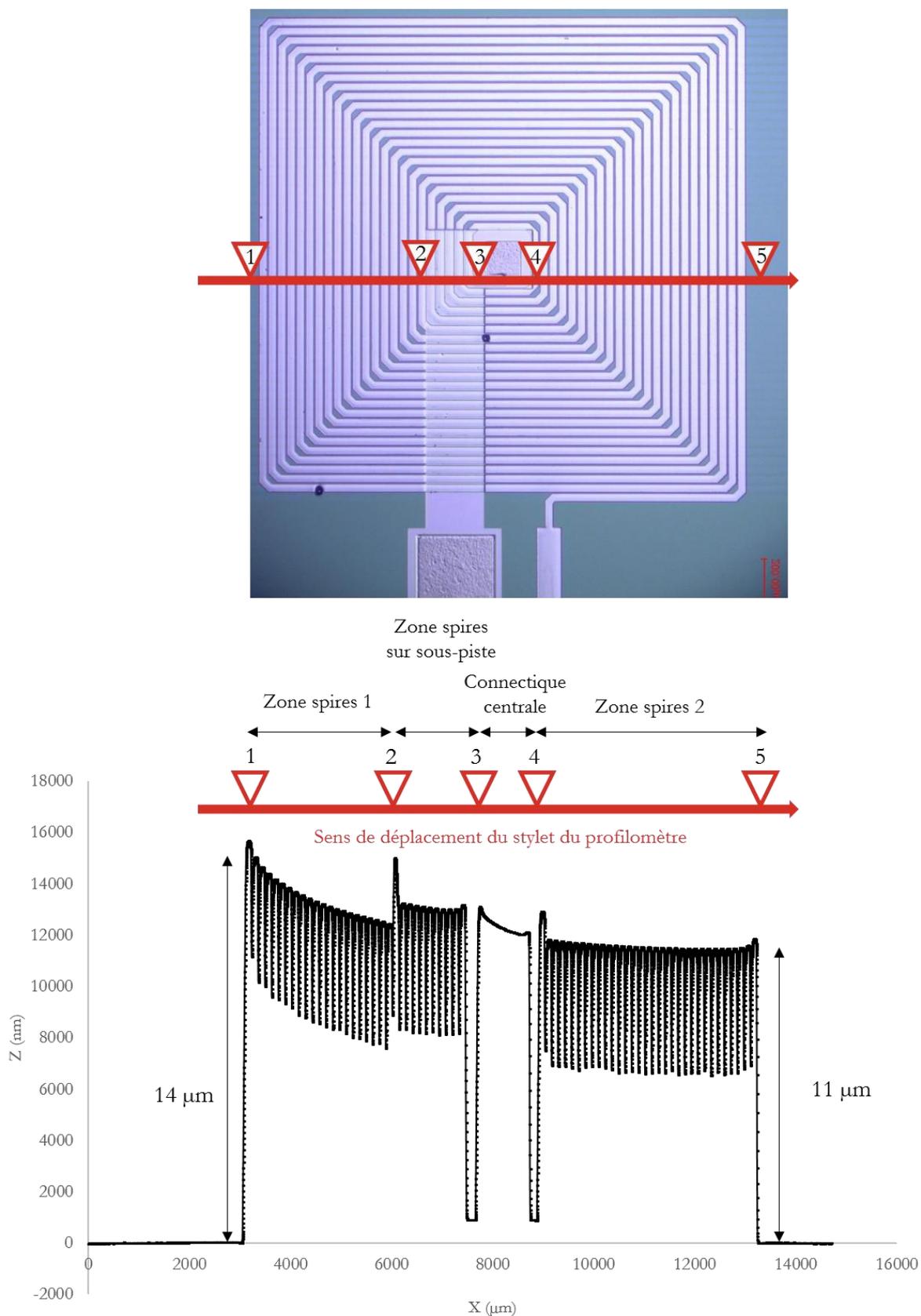


Figure 4 - 27. Mesure au profilomètre mécanique du micromoulage des bobines de cuivre avec les zones correspondantes sur la face de la bobine

1.2.5. Conditionnement des microbobines

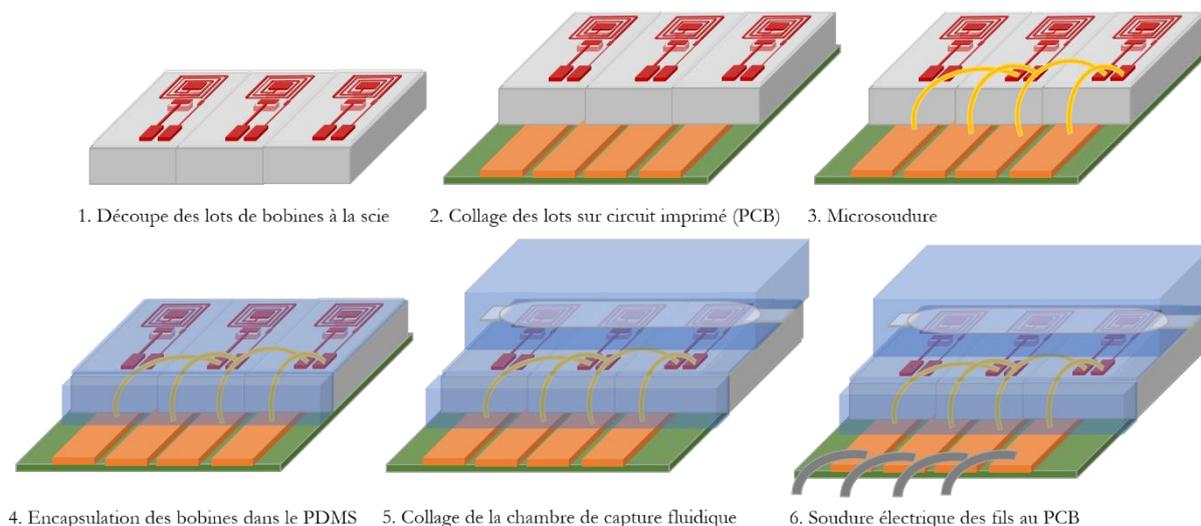


Figure 4 - 28. Etapes de conditionnement des microbobines après leur fabrication

1.2.5.1. Découpe des bobines et collage sur PCB

Les substrats comprenant douze lots de trois bobines de géométries variables, les lots sont découpés pour être séparés et utilisés indépendamment pour les caractérisations électriques et les tests microfluidiques. Les substrats sont donc découpés à l'aide d'une scie en diamant.

Les lots de bobines sont collés sur des plaques de circuits imprimés (PCB) réalisées à l'IUT de Cachan. Les plaques comprennent de larges pistes de cuivre afin d'assurer la connexion électrique des bobines avec les appareils de mesures et d'excitation. Pour cela, les morceaux de silicium comprenant les bobines sont collés sur le PCB par une colle temporaire (Crystal Bond, Polytec) chauffée à 100°C pour permettre la réutilisation des plaques en cas de détérioration des bobines. Les bobines vont ainsi pouvoir être connectées électriquement par deux étapes de soudure.

1.2.5.2. Microsoudure des bobines, protection et encapsulation

Pour assurer la connexion des bobines aux pistes de cuivre du PCB, les deux éléments sont reliés par une microsoudure en or. Pour cela une microsoudeuse à ultrasons est utilisée avec un fil d'or de 20 μm de diamètre (Figure 4 - 29A). Ces connexions étant très fragiles, il est nécessaire de les protéger avant d'encapsuler les bobines.

Pour cela, du PDMS (10 :1 Sylgard184) est coulé sur les points de microsoudure. Puis les bobines sont encapsulées dans du PDMS en enduisant le substrat avec une couche de 20 μm de PDMS (3000 rpm, 30s, 1000 rpm/s). Ainsi, les bobines et les soudures sont protégées et isolées de l'extérieur, en particulier des solutions utilisées en microfluidique par la suite (Figure 4 - 29B).

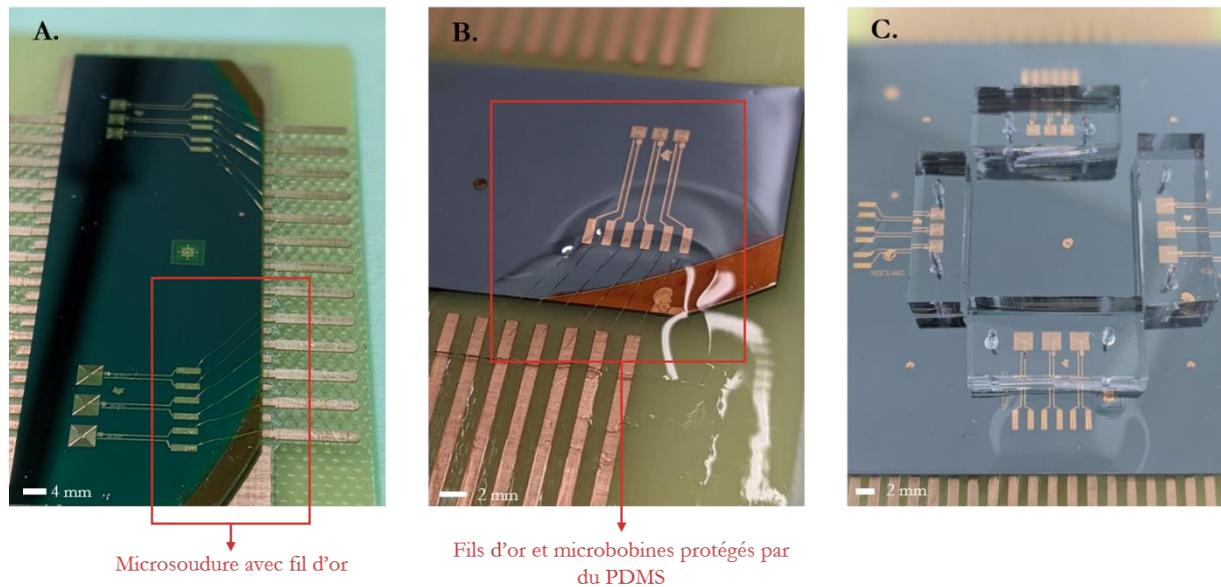


Figure 4 - 29. Finalisation des dispositifs de capture : **A.** Microsoudure à l'or sur PCB ; **B.** Protection et encapsulation des bobines et des soudures avec du PDMS ; **C.** Collage des chambres de capture en PDMS.

1.2.6. Intégration du circuit microfluidique et soudure des fils électriques

Pour permettre la capture et la manipulation des billes magnétiques en conditions microfluidiques, des chambres de capture sont réalisées en PDMS à l'aide de moule SU8 réalisés comme précisé dans le chapitre 2. Les chambres sont ensuite découpées, les entrées fluidiques sont percées et l'ensemble est collé par plasma O_2 sur les bobines protégées comme expliqué dans le chapitre 2 pour la fabrication des puces microfluidiques de détection (voir Figure 4 - 29C).

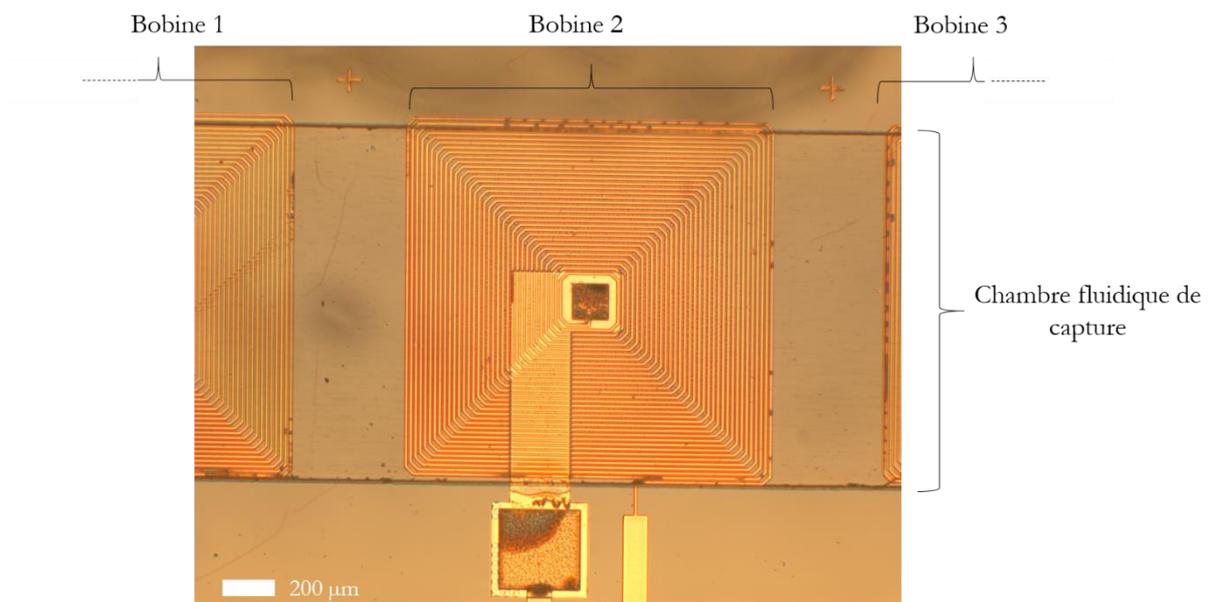


Figure 4 - 30. Photographie au microscope optique de la chambre fluide de capture positionnée sur un lot de microbobines (grossissement x4)

Afin d'assurer un bon alignement des chambres avec les bobines pour une capture efficace des billes au sein du canal, le collage est effectué sous une loupe binoculaire. L'ajout d'une goutte d'éthanol sur le PDMS avant collage permet de le manipuler quelques instants pour ajuster sa position avant que le collage ne devienne irréversible. La Figure 4 - 30 montre l'intégration des bobines dans les chambres microfluidiques.

Enfin, les pistes de PCB reliées aux bobines sont soudées à l'étain avec des fils électriques monobrins de section 0.2 mm^2 . Les dispositifs peuvent ainsi être reliés aux appareils de mesure électriques et au système d'alimentation des bobines pour les caractérisations électriques et les tests fluidiques réalisés dans la suite de ce chapitre. La Figure 4 - 31 présente le dispositif final.

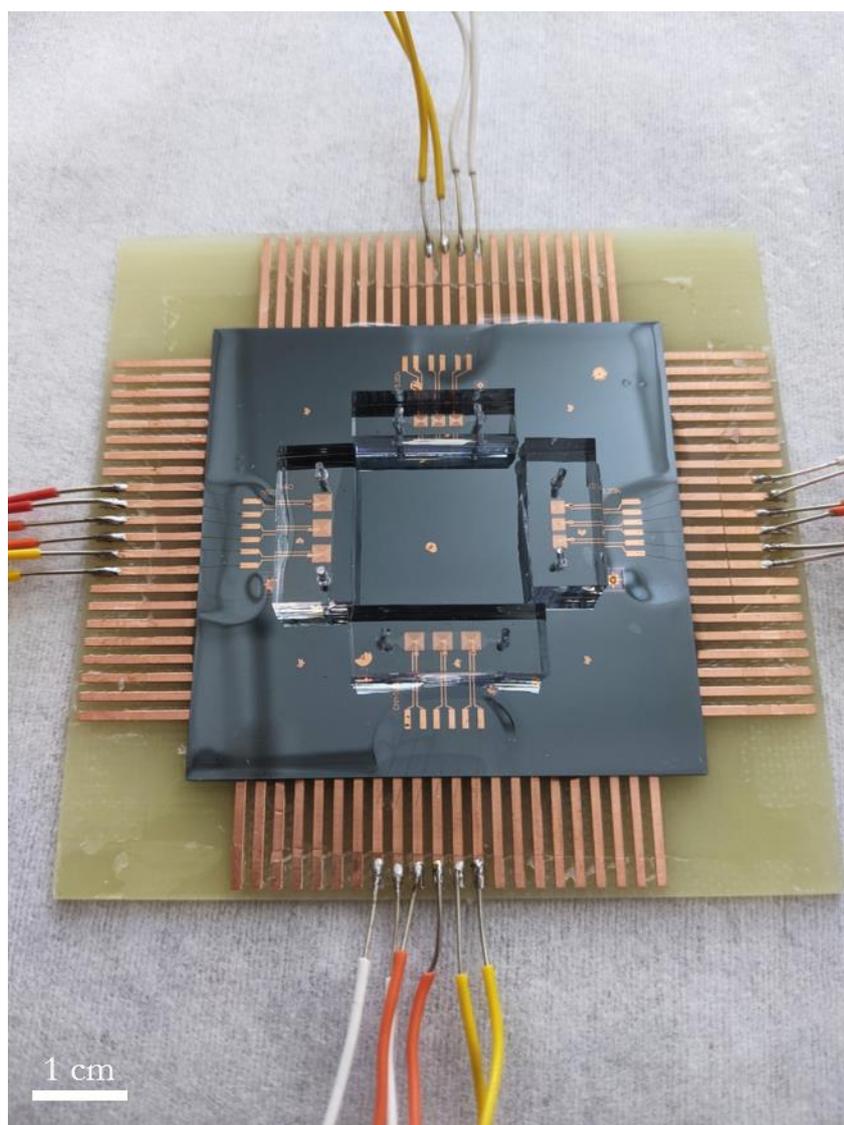


Figure 4 - 31. Dispositif fluide final intégrant les microbobines de capture soudées sur PCB, encapsulées dans le PDMS et intégrées aux chambres microfluidiques pour la capture des billes magnétiques.

1.3. Fabrication d'un système de capture optimisé avec substrat magnétique

Nous avons vu dans la partie 1 que plusieurs exemples dans la littérature ont montré l'intérêt des matériaux ferromagnétiques associés aux électroaimants afin d'amplifier l'induction magnétique obtenue pour un champ magnétique donné. La forte perméabilité relative de ces matériaux permet de concentrer les lignes de champ magnétique et ainsi d'amplifier le champ magnétique local. Les travaux de thèse d'Olivier Lefebvre [2] au sein du C2N ont mis en évidence l'intérêt d'intégrer du Permalloy ($\text{Fe}_{20}\text{Ni}_{80}$) autour des microbobines afin d'améliorer leur sensibilité.

Plus particulièrement, le simple ajout d'un substrat de Permalloy sous les bobines améliorerait les performances magnétiques des bobines en canalisant les lignes de champ magnétique générées par la microbobine. Cela permettrait d'augmenter l'intensité maximale de champ atteignable et le facteur de mérite de puissance, défini dans la partie 1.1, entre le champ magnétique produit pour une intensité de courant donnée et la puissance dissipée par effet Joule. L'ajout d'une couche de 10 μm de Permalloy sous les bobines augmenterait le champ magnétique jusqu'à + 38%. Ce phénomène se stabiliserait au-delà d'une certaine épaisseur de matériau [2].

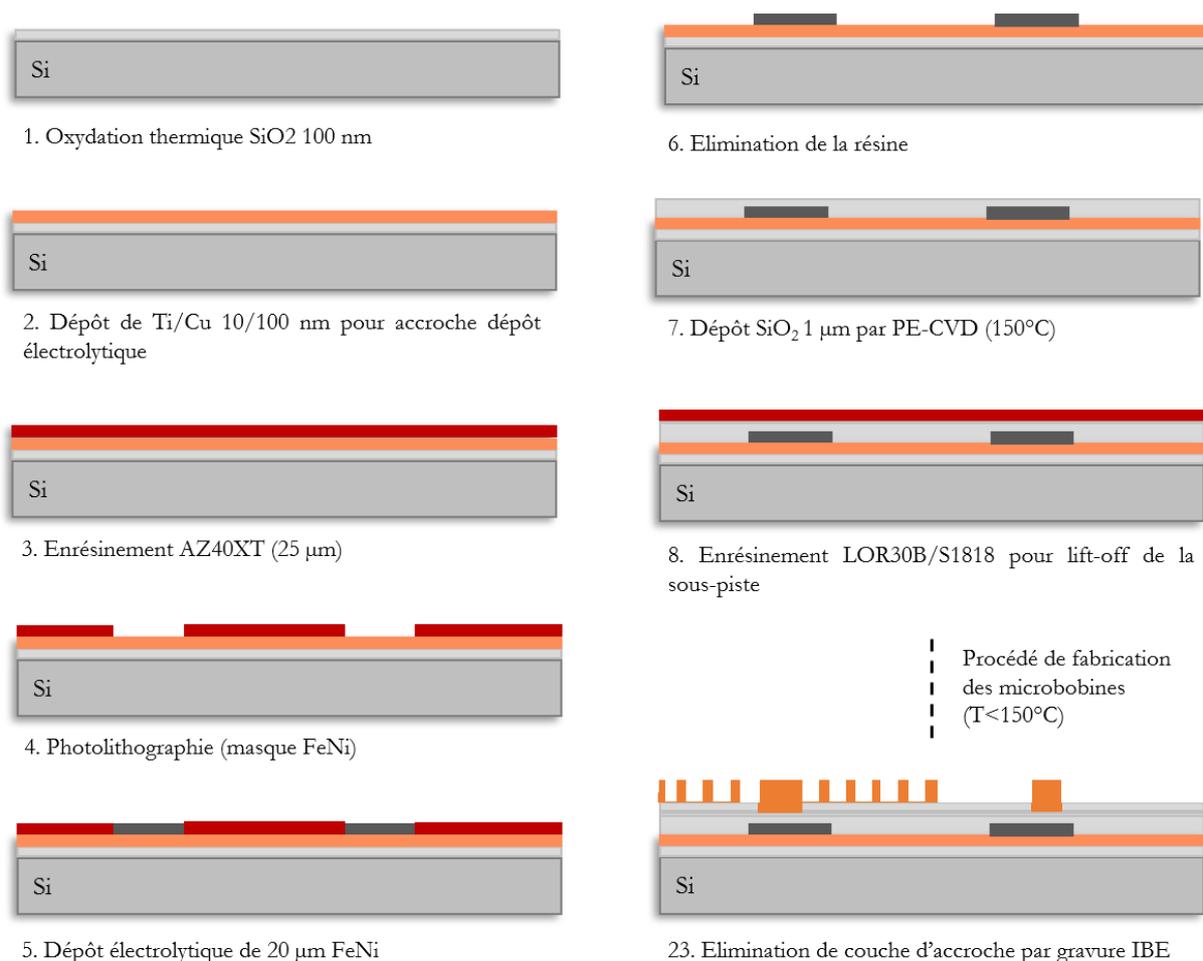


Figure 4 - 32. Procédé de fabrication des microbobines intégrant un substrat de Permalloy

Aussi, nous avons souhaité exploiter cette hypothèse afin de fabriquer des bobines optimisées intégrant une couche de Permalloy de $20\ \mu\text{m}$ sous les bobines fabriquées selon le procédé présenté dans la partie 1.2 (voir Figure 4 - 32). L'épaisseur de $20\ \mu\text{m}$ a été choisie comme un compromis entre l'amélioration des performances magnétiques et un temps de fabrication raisonnable, car les couches épaisses de Permalloy nécessitent plusieurs heures de dépôt.

Ces couches sont déposées par micromoulage en dépôt électrolytique, dans un procédé similaire au dépôt de cuivre. La procédure de dépôt de couche épaisse a notamment été mise au point par Olivier Lefebvre au cours de sa thèse [2]. Le protocole utilisé au cours de cette thèse a été adapté à partir de ces travaux. En effet, entre les deux études, certains composants du dispositif expérimental et de l'interface machine ainsi que les conditions de salle blanche ont été modifiés. Des étapes de caractérisation et d'optimisation ont donc été nécessaires.

1.3.1. Micromoulage des bases de Permalloy

Le micromoulage du Permalloy nécessite les mêmes étapes de préparation que pour le micromoulage du cuivre décrit dans la partie 1.2.4. Le substrat de silicium est d'abord nettoyé et oxydé thermiquement pour être isolé avec une couche de silice de $100\ \text{nm}$. Puis une couche d'accroche de $10\ \text{nm}$ de Ti et $100\ \text{nm}$ de Cu est déposée par évaporation sous vide afin d'assurer le contact nécessaire sur le substrat pour le dépôt électrolytique du Permalloy.

Les motifs correspondant aux bases de Permalloy sont définis par rapport aux masques utilisés dans la partie 1.2 afin d'obtenir une base soutenant l'ensemble des 3 bobines des différents lots. Le masque a été dessiné sur un logiciel de dessin vectoriel (Inkscape ®) et imprimé sur film transparent. La résolution des motifs n'étant pas exigeante pour cette étape, ce type de masque se révèle bon marché et rapide à obtenir. La Figure 4 - 33 présente le masque utilisé.

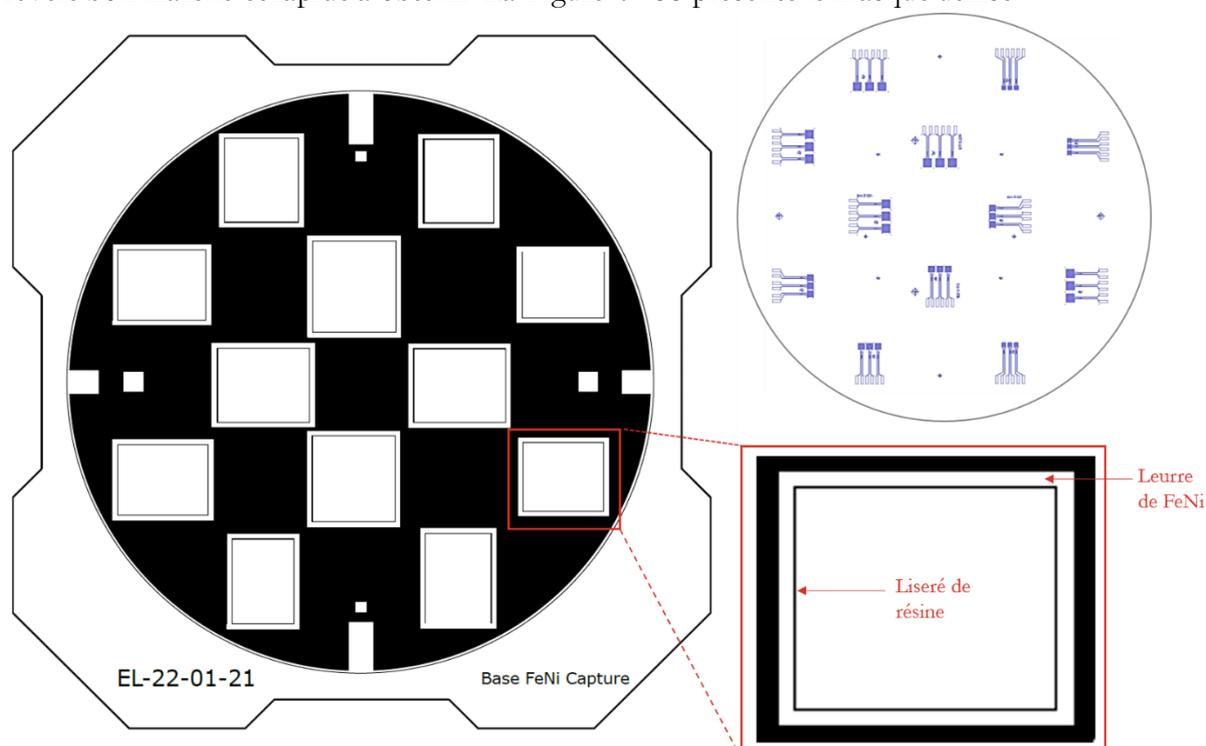


Figure 4 - 33. Masque utilisé pour le micromoulage du substrat de Permalloy sous les bobines de cuivre, intégrant un leurre pour le dépôt électrolytique

Nous pouvons remarquer que les rectangles correspondant aux bases de Permalloy devant être déposées coïncident avec le masque des bobines présenté en Figure 4- 11. Ces motifs sont entourés de bordures séparées par un liseré de résine. Ce type de design a été développé par Olivier Lefebvre [2] afin de réduire les effets de bords ou « oreilles de chat » lors du dépôt électrolytique. Ce phénomène se caractérise par des variations d'épaisseurs très importantes sur le bord des motifs du fait d'une possible concentration des lignes de courant sur les bords des motifs lors du dépôt. L'utilisation de bandes de « leurre » autour des motifs a précédemment permis de réduire ce phénomène [2].

Pour réaliser 20 μm de Permalloy, une résine épaisse et résistante au bain électrolytique doit être utilisée. Ce type de dépôt ayant déjà été mis au point au sein du laboratoire, la résine utilisée pour des épaisseurs de 20 à 50 μm est l'AZ40XT (Microchem). Elle présente l'avantage de pouvoir former des couches épaisses sans nécessiter de long temps de réhydratation ou de recuit.

Le montage de dépôt électrolytique est similaire à celui de cuivre présenté sur la Figure 4 - 26, mais la contre-électrode est une plaque de nickel et le bain n'est pas agité. Sa composition est également différente : il est composé de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.75 M), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02 M), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03 M), d'acide borique H_3BO_3 (0.4M) et de saccharine (0.016 M).

Par ailleurs, la procédure de dépôt est différente. Alors que le dépôt était en courant continu à une densité fixée pour le dépôt de cuivre (-30 mA/cm^2), ici le dépôt se fait en courant pulsé, alternant entre deux densités de courants différentes (-10 mA/cm^2 pendant 20 ms et 22.5 mA/cm^2 pendant 2.22 ms). Ces conditions sont issues de plusieurs études réalisées au sein du laboratoire [2,8,9].

Les 20 μm de Permalloy sont ainsi déposés en 230 minutes en respectant différentes étapes :

- (i) 4 dépôts de 1 minute en faisant tourner l'échantillon de 90° entre chaque dépôt et 10 minutes de repos entre chaque dépôt ;
- (ii) 1 jour de repos permettant aux premières couches de se relaxer ;
- (iii) 4 dépôts de 10 minutes en faisant tourner l'échantillon de 90° et 30 minutes de repos entre chaque dépôt ;
- (iv) Des cycles de 30 minutes en faisant tourner l'échantillon de 90° et 30 minutes de repos entre chaque dépôt jusqu'à l'épaisseur souhaitée.

La rotation du substrat entre chaque dépôt permet d'homogénéiser les épaisseurs le long de l'échantillon. En effet, le courant étant apporté par l'intermédiaire d'une seule pince en un point de l'échantillon, la densité de courant varie le long du wafer en s'éloignant de la pince, résultant en des variations de la vitesse de croissance le long de la surface, comme observé pour le dépôt de cuivre.

Les différentes séquences de dépôt et les temps de repos sont importants car le Permalloy est un matériau présentant des contraintes importantes. Pour des épaisseurs importantes il est nécessaire de laisser la structure se relaxer pour éviter de la fragiliser et qu'un décrochement survienne [2]. La vitesse de croissance étant relativement lente ($\approx 75 \text{ nm/min}$), le dépôt de 20 μm demande beaucoup de temps en considérant ces temps de repos.

La qualité du dépôt est caractérisée au profilomètre mécanique pour les épaisseurs et en spectroscopie EDX afin de suivre la composition de l'alliage de Permalloy.

La Figure 4 - 34 présente le profil mesuré sur le substrat de Permalloy après 230 minutes (3h50) de dépôt et avant élimination de la résine. Le motif comprend le leurre, cette bande de motif entourant le substrat à déposer. Nous pouvons voir que la différence d'épaisseur est particulièrement importante sur la zone du leurre, et plus réduite sur la zone de la base rectangulaire. En revanche, entre le centre du rectangle et le bord, une différence d'épaisseur d'une dizaine de microns est mesurée. Ces effets de bords peuvent poser un problème ensuite pour la planéité du substrat et provoquer des difficultés sur les étapes d'alignement en lithographie dans les étapes ultérieures ou pour le fluage de la résine lors de l'enrésinement. Le leurre permet de minimiser ces effets de bord en redistribuant les lignes de courant le long du motif lors du dépôt. Ce phénomène est de plus en plus important quand l'épaisseur du dépôt augmente. Cela constitue également un argument pour réduire la durée de dépôt avec une couche de Permalloy de 20 μm (contre 50 μm dans les travaux de O. Lefebvre). Néanmoins, il est important de noter que bien que le phénomène soit réduit, il reste présent.

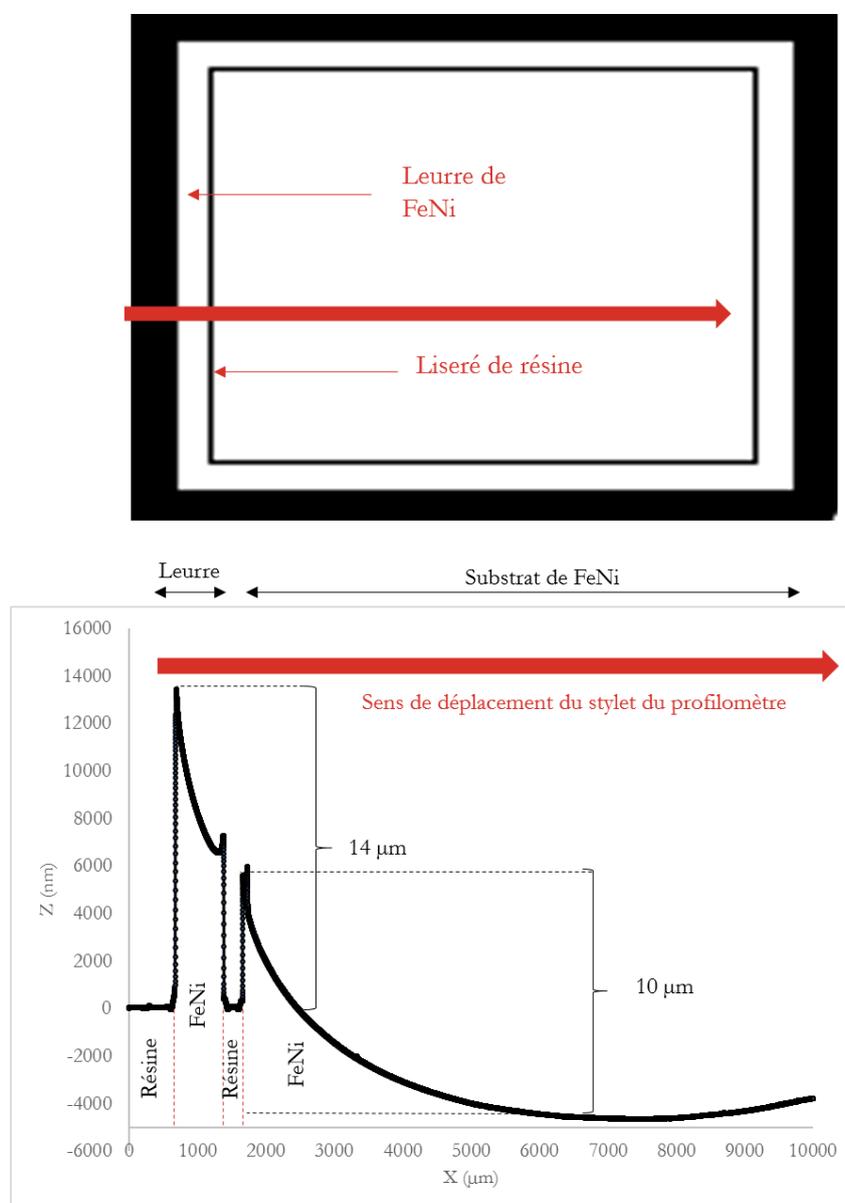


Figure 4 - 34. Profil mesuré au profilomètre mécanique du micromoulage de Permalloy après 230 min de dépôt électrolytique

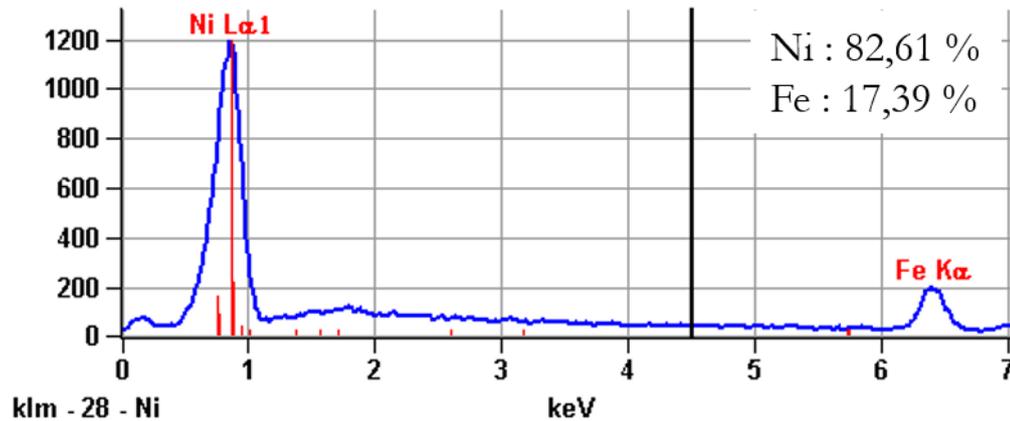


Figure 4 - 35. Spectre EDX de l'analyse du substrat de Permalloy déposé par dépôt électrolytique (15 kV, 60s d'acquisition)

Les mesures de spectroscopie EDX permettent également de suivre la qualité du dépôt. En effet, il est important de vérifier les proportions relatives de deux métaux dans l'alliage $\text{Fe}_{20}\text{Ni}_{80}$. Une variation trop importante de la stœchiométrie indique une détérioration des conditions opératoires (composition du bain, mauvais contact...). Nous pouvons voir sur la Figure 4 - 35 le spectre EDX réalisé sur le substrat déposé. Les proportions stœchiométriques sont de 82.61% de Ni et 17.39% de Fe ; ce qui reste très proche des proportions visées (80/20). Aussi, la qualité du dépôt et donc les propriétés magnétiques du matériau sont assurées.

Après micromoulage des bases de Permalloy, la résine est éliminée dans un bain d'acétone. Pour permettre la suite du protocole de fabrication des bobines identiques au protocole de la partie 1.2, les bases de Permalloy doivent ensuite être isolées électriquement.

1.3.2. Isolation électrique des bases de Permalloy

Le substrat de Permalloy doit être isolé électriquement afin d'éviter que les sous-pistes de cuivre déposées au niveau suivant ne soient connectées entre elles, à l'instar du substrat de silicium de départ pour le procédé de la partie 1.2.

Dans les travaux d'O. Lefebvre [2], cette étape était réalisée avec du polyimide, un polymère isolant pouvant être enduit sur le substrat en fine couche (5 μm) et microstructuré par photolithographie si nécessaire. L'avantage du polyimide réside dans son mode de préparation et l'épaisseur de diélectrique atteignable permettant d'aplanir le substrat malgré les variations de planéité dû aux effets de bord du dépôt de Permalloy. Par ailleurs, l'adhésion des couches métalliques déposées dans les étapes ultérieures est également assurée. Malheureusement c'est aussi un produit particulièrement cher et difficile à obtenir. Nous avons donc cherché des alternatives moins coûteuses pour réaliser cette étape.

Notre choix s'est porté sur le dépôt d'une couche de silice, déjà utilisée dans l'isolation des bobines. L'accroche des couches métalliques sur ce type de couche n'était donc pas à prouver. Par ailleurs, un procédé de dépôt de SiO_2 en PE-CVD à basse température avait été développé pour l'isolation des bobines comprenant du Permalloy [2]. En effet, les dépôts de silice sont

généralement réalisés à des températures proches de 300°C en PE-CVD. Or le Permalloy est sensible à la température et voit ses propriétés magnétiques se dégrader au-delà de 150°C ainsi que sa structure mécanique fragilisée. Ce procédé « basse température » a donc été utilisé pour isoler électriquement le Permalloy.

Pour étudier la couche de silice nécessaire à l'isolation des deux niveaux (FeNi et Ti/Cu), des échantillons de 2 cm² de Permalloy ont été préparés. Différentes épaisseurs de SiO₂ ont été déposées par PE-CVD (200, 500, 700, 1000 nm). Un motif en quadrillage a été réalisé en photolithographie avec de la résine S1818 avant le dépôt de Ti/Cu (10/800 nm) afin de réaliser un lift-off permettant d'avoir des carrés indépendants de Ti/Cu sur le substrat. Une mesure de la conductivité électrique est ensuite réalisée à l'aide d'un multimètre entre deux zones de l'échantillon. Le procédé de caractérisation est schématisé sur la Figure 4 - 36. Les résultats des mesures sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 4 - 3. Mesures de résistance effectuée sur les échantillons de test d'épaisseur de couche d'isolation du FeNi et du Ti/Cu

Epaisseur de SiO ₂ (nm)	200	500	700	1000
Résistance mesurée entre deux carrés de cuivre de l'échantillon (Ω)	1.2	1.2	1.2	∞

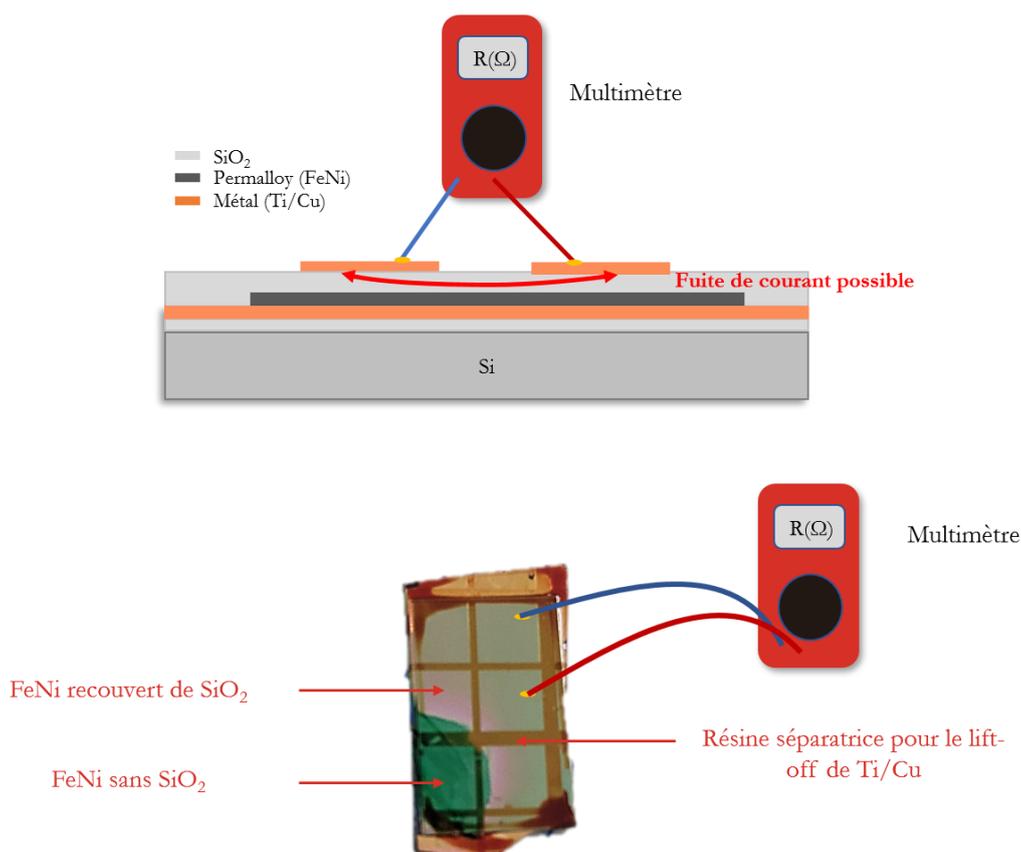


Figure 4 - 36. Schéma du protocole de caractérisation des épaisseurs de SiO₂ nécessaires à l'isolation des niveaux de FeNi et Ti/Cu. Le dépôt de Ti/Cu n'a pas encore été réalisé sur l'échantillon présenté sur la photographie.

Les premiers dépôts réalisés à 200, 500 et 700 nm montraient bien une isolation de la surface en mesure 4 pointes avec une résistivité infinie des zones de Permalloy recouvertes de silice. En revanche, après le dépôt de Ti/Cu à l'étape suivante pour la fabrication des sous-pistes des bobines, des fuites de courant ont été observées, probablement dues à la migration du cuivre dans les couches de diélectrique. Les premiers essais ont notamment conduit à l'échec de la fabrication du dispositif présenté en Figure 4 - 37A. Aussi, une épaisseur de 1 μm de silice a été utilisée pour garantir une isolation suffisante du substrat, compatible avec les étapes ultérieures.

Pour la suite du processus, l'ensemble des étapes sont identiques au procédé décrit pour les microbobines seules. La seule contrainte à respecter tout le long du procédé a été de ne pas dépasser 150°C dans les étapes nécessitant un traitement thermique. La Figure 4 - 37A présente une photographie d'un échantillon global après la dernière étape de fabrication correspondant à la gravure IBE de la couche d'accroche des microbobines (voir Figure 4 - 32). Ce dispositif bien qu'achevé a montré des fuites de courant entre les bobines du fait d'une couche de SiO_2 insuffisante entre le substrat de FeNi et la sous-piste des bobines. Ce premier échantillon a notamment été à l'origine de l'étude sur l'épaisseur de cette couche de diélectrique (voir Figure 4 - 36 et Tableau 4 - 3).

La Figure 4 - 37B montre des bobines obtenues avec ce procédé avant la dernière étape de gravure IBE. Leur caractérisation n'a pas pu être réalisée dans la suite du chapitre en raison d'une panne prolongée du bâti de gravure IBE, empêchant la finalisation d'un dispositif fonctionnel. Il n'a donc pas été possible d'évaluer les performances magnétiques potentiellement améliorées des bobines comprenant un substrat de Permalloy dans les délais de cette thèse. Par conséquent, l'ensemble des résultats suivants ne concernent que les microbobines seules, mais demeurent néanmoins de premiers éléments de validation de l'utilisation de ces dispositifs pour la capture des billes magnétiques.

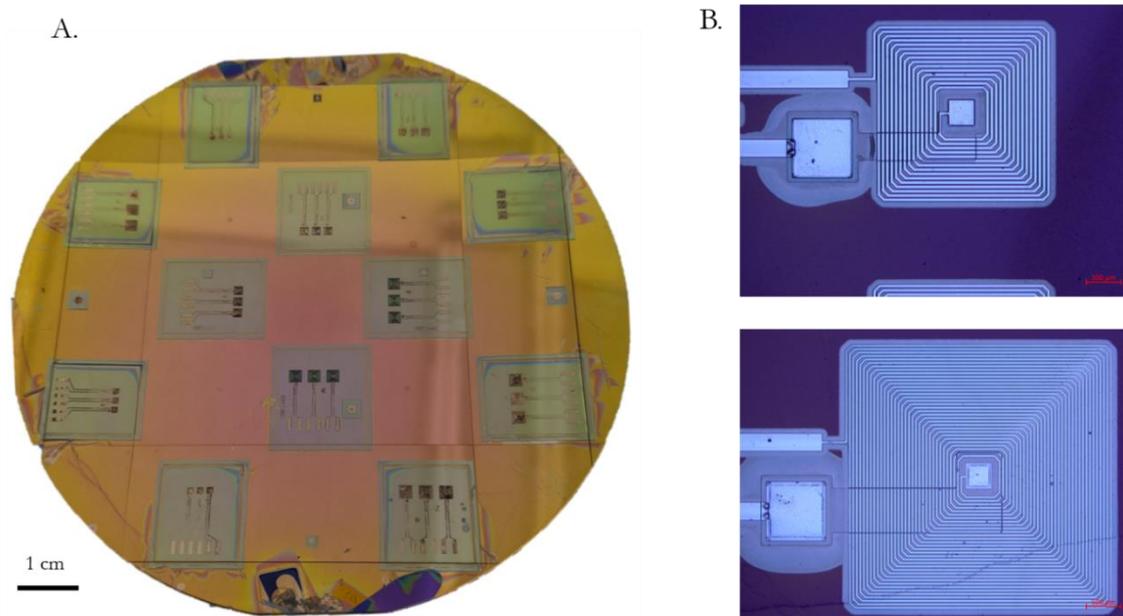


Figure 4 - 37. **A.** Photographie du substrat de fabrication des microbobines intégrant la base de Permalloy ; **B.** Photographie au microscope optique de deux bobines comprenant un substrat de Permalloy avant l'étape de gravure IBE (grossissement x5).

2. Caractérisation électrique et fluidiques des dispositifs de capture

Dans la partie précédente, nous avons abordé le procédé de microfabrication des microbobines en salle blanche. En cours de procédé, la qualité des réalisations a été suivie par des techniques de caractérisation optique, électrique, mécanique ou spectroscopique. Néanmoins, l'intégrité du dispositif n'est assurée qu'après son encapsulation finale, chaque étape ultérieure pouvant endommager les étapes précédentes. Aussi, des tests de caractérisation électrique et fluidique ont été réalisés dans la partie suivante afin d'évaluer le bon fonctionnement des dispositifs fabriqués.

Premièrement, la continuité électrique des microbobines est indispensable afin que le courant circule dans l'ensemble des spires des bobines pour une génération optimale du champ magnétique. De plus, une mauvaise continuité électrique entraînera une résistance plus importante de la bobine et donc un échauffement par effet Joule. En effet, comme expliqué dans la partie 1 de ce chapitre, il s'agit de trouver un compromis entre l'intensité du champ magnétique (qui est proportionnelle à l'intensité du courant circulant dans la bobine) et l'échauffement par effet Joule (également proportionnel à l'intensité électrique et à la résistance de la bobine). Enfin, l'étanchéité du dispositif fluidique est également indispensable pour permettre l'injection des billes en solution dans le canal microfluidique. Aussi, trois types de caractérisation ont été réalisés pour évaluer les performances des dispositifs : électrique, thermoélectrique et fluidique.

2.1. Caractérisation électrique des microbobines

Afin d'évaluer la continuité électrique des bobines et des dispositifs encapsulés, plusieurs mesures de la résistance ont été réalisées.

Tout d'abord, après gravure de la couche d'accroche du dépôt électrolytique de cuivre par IBE, la continuité des bobines est évaluée au multimètre en salle blanche afin de vérifier que le courant circule correctement d'une connectique à l'autre. En fonction de la géométrie de la bobine, des mesures variant de 2 à 30 Ω ont été obtenues. Les variations entre bobines de même géométrie proviennent de défauts structurels. Par ailleurs, en cas de résistance infinie, la conduction n'est pas assurée et les bobines concernées doivent être écartées. L'origine de ces dysfonctionnements peut alors être multiple.

En effet, un défaut dans la dernière étape de lithographie des bobines ou dans la croissance électrolytique des spires entraînent indéniablement une rupture d'une des spires, conduisant généralement à un court-circuit. Sur les Figure 4 - 38A et B sont présentés différents défauts visibles lors de la fabrication des bobines. Ces défauts auront pour effet d'empêcher la circulation du courant dans le dispositif et une résistance infinie sera mesurée.

D'autres défauts plus difficiles à observer concernent la gravure des ouvertures dans la silice. Les zones de contact entre les deux niveaux de cuivre étant restreintes, une gravure incomplète peut entraîner une rugosité dans la zone de contact qui impactera la conduction entre les deux niveaux de cuivre. Cela aura pour effet d'augmenter la résistance. La Figure 4 - 38C montre une photographie MEB d'une zone de silice mal gravée avec une rugosité visible. Les Figure 4 - 38D à F montrent des défauts dans le dépôt par PE-CVD de la silice occasionnant un faïençage du

matériau et un décollement possible des niveaux supérieurs ou des défauts de conductivité électrique dans la sous-piste.

Enfin, l'étape d'encapsulation dans le PDMS après microsoudure est également une étape très critique car les contacts de microsoudure avec les fils d'or sont particulièrement fragiles. Ces fils sont protégés dans du PDMS avant enduction de la couche d'isolation de PDMS sur les bobines afin d'éviter leur arrachement (voir Figure 4 - 29B), mais il n'est pas rare que certains fils se rompent à cette étape. Les bobines présentant une rupture de la continuité électrique et donc une résistance infinie sont donc écartées des lots pour la suite des tests.

Les dispositifs fonctionnels après ces premiers tests préalables lors des étapes de fabrication sont ensuite caractérisés électriquement plus précisément par un impédancemètre en dehors de la salle blanche. L'impédance obtenue dépendra des différents défauts présentés ainsi que de la géométrie de la bobine. Les mesures sont réalisées sur plusieurs lots de bobines, avec des géométries différentes et sont effectuées en courant continu.

De même, s'agissant de bobines présentant une impédance électrique avec une composante résistive et une composante inductive ($Z = R + jL\omega$ où R est la résistance et L l'inductance), la mesure de l'inductance a été réalisée en courant alternatif à une fréquence de 100 kHz à l'aide d'un impédancemètre.

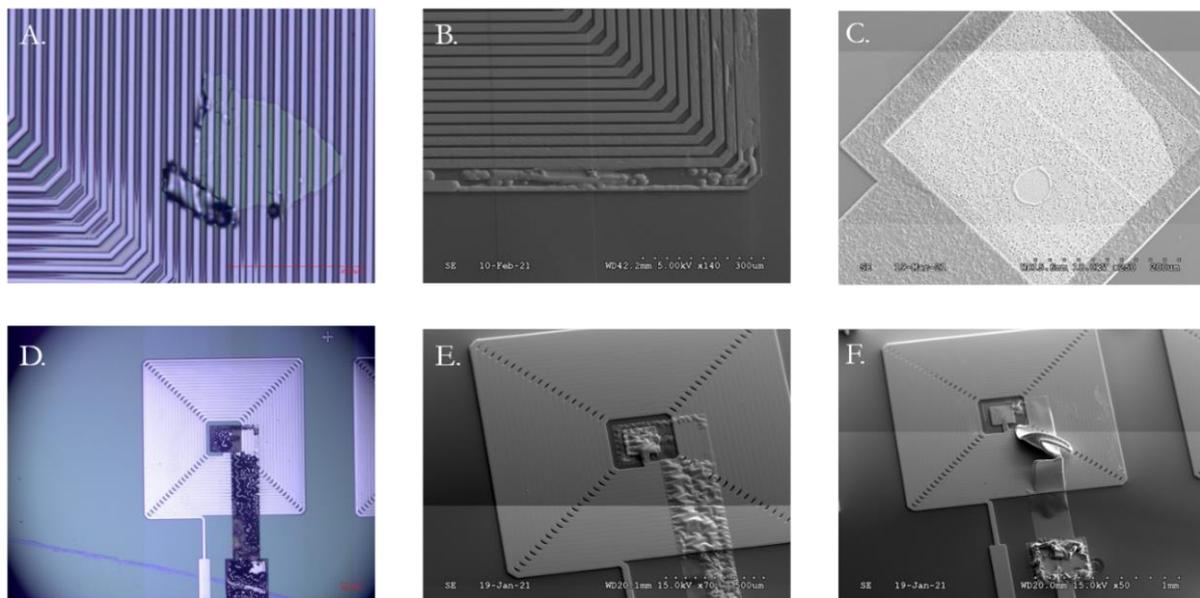


Figure 4 - 38. Exemples de défauts visibles dans la réalisation des bobines : **A.** Défaut de lithographie ; **B.** Défaut de croissance de cuivre ; **C.** Rugosité résiduelle après gravure de la SiO₂ ; **D – E.** Faiénçage de la silice ; **F.** Décollement de la sous-piste

Tableau 4 - 4. Récapitulatif des bobines fonctionnelles après fabrication selon leur paramètres géométriques

Paramètres géométrique	Nombre bobines fonctionnelles
$R = 500 \mu m$ $L = 10 \mu m$ $N = 20$	1
$S = 10 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 15$	11
$R = 750 \mu m$ $L = 10 \mu m$ $N = 33$	10

$S = 10 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 25$	5
$L = 20 \mu m$ $N = 20$	1
$L = 10 \mu m$ $N = 46$	11
$R = 1000 \mu m$ $L = 15 \mu m$ $N = 35$	0
$S = 10 \mu m$ $L = 20 \mu m$ $N = 30$	5
$L = 30 \mu m$ $N = 23$	5
Total	49

Deux substrats de fabrication de microbobines ont été caractérisés. Sur les 66 bobines fabriquées, 49 étaient fonctionnelles, soit un rendement de fabrication de 75%. La répartition des bobines fonctionnelles selon leur géométrie est donnée dans le Tableau 4 - 4 : rayon R, nombre de spires N, largeur des spires L (la distance inter-spires S étant fixée à $10 \mu m$ pour toutes les bobines).

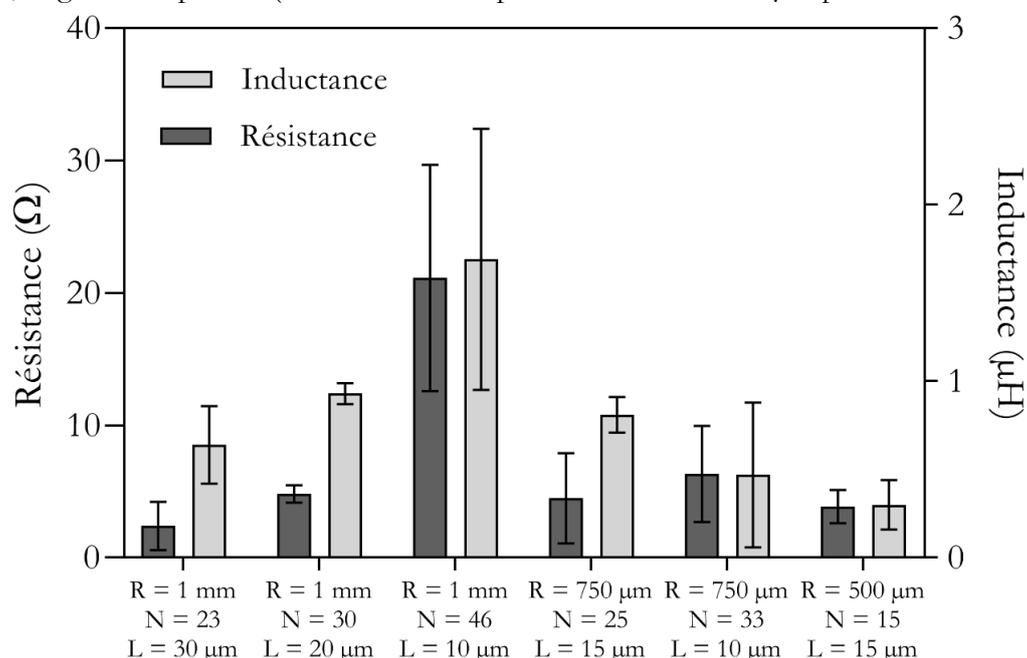


Figure 4 - 39. Synthèse des mesures de résistance et d'inductance sur les microbobines de cuivre fabriquées en salle blanche après encapsulation dans le PDMS ($n = 49$). R : rayon de la bobine, N : nombre de spires, S : largeur des spires

Les mesures électriques sont ensuite regroupées par géométrie de bobines sur la Figure 4 - 39. Nous pouvons observer que la géométrie des bobines a un impact sur les caractéristiques électriques. Cependant, il est difficile de tirer des conclusions sur le nombre d'échantillons caractérisés. En particulier, les défauts précités influencent également les performances des bobines, ce qui s'illustre par quelques barres d'erreurs importantes. Néanmoins, le graphique obtenu permet de visualiser la distribution des mesures électriques réalisées sur les échantillons et l'ordre de grandeur des résistances et inductances relevées. La valeur des résistances pour chaque bobine influencera fortement l'énergie dissipée par effet Joule et donc la chaleur produite par la bobine pendant son fonctionnement. Il s'agit donc de trouver le meilleur compromis entre capacité de capture des bobines et énergie thermique dissipée par effet Joule. Pour cela, il est intéressant

d'effectuer des relevés de température à proximité des bobines lorsque du courant est injecté dans le dispositif.

2.2. Caractérisation thermoélectrique des bobines

Après la caractérisation électrique des bobines, il est nécessaire de s'intéresser à leur performance énergétique et plus particulièrement, à l'énergie dissipée par effet Joule.

La température de fonctionnement des dispositifs est un point essentiel pour leur application aux immunodosages sur billes. En effet, au-delà de 40°C, l'intégrité des espèces biologiques n'est plus assurée et la vitesse des réactions est fortement perturbée. Il est donc nécessaire de contrôler que de telles températures ne soient pas atteintes dans les dispositifs lors de leur mise sous tension.

Des relevés de température ont alors été réalisés à proximité de la bobine pour différentes intensités de courant injecté. Pour cela, une thermistance de type K est intégrée au canal microfluidique servant à encapsuler les bobines comme le montre la Figure 4 - 40.

Pour ces mesures, de l'eau déionisée est injectée dans le canal à un débit de 10 μL /min pour simuler le fonctionnement du dispositif. Des relevés de température ont été effectués sur deux bobines de géométrie différente afin d'évaluer leur échauffement en fonction de l'intensité du courant injecté. Les relevés sont effectués 5 minutes après avoir fixé le courant afin de permettre à la température du dispositif de se stabiliser. Les résultats sont présentés sur la Figure 4 - 41.

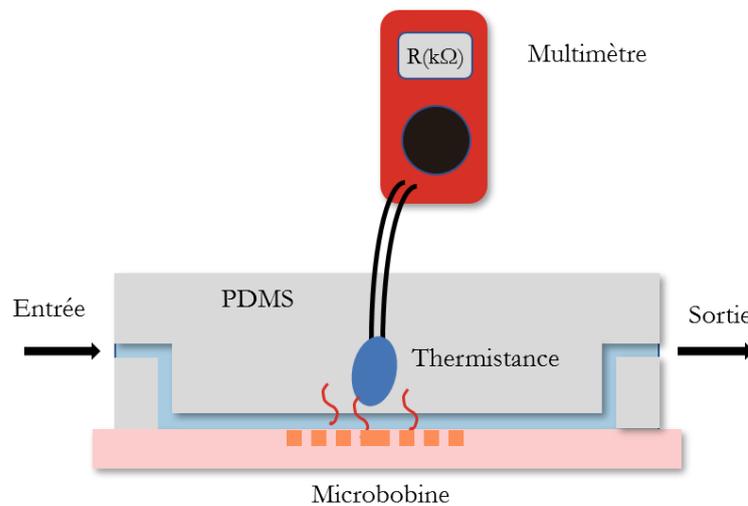


Figure 4 - 40. Schéma du principe de mesure de l'échauffement au sein du canal microfluidique lors de l'injection de courant dans les bobines

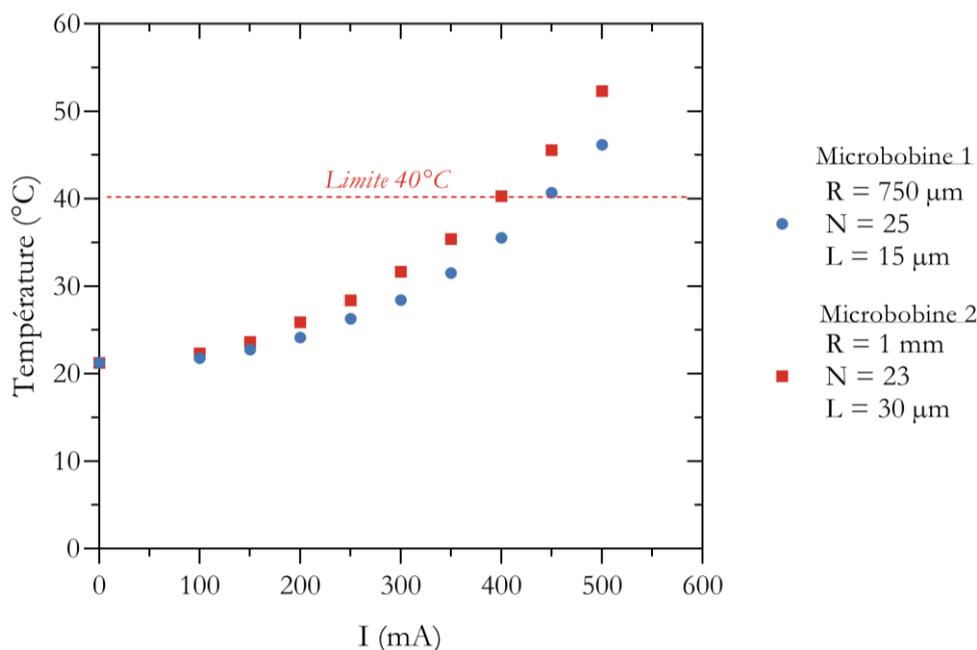


Figure 4 - 41. Évolution de la température à proximité de deux types de bobines en fonction de l'intensité du courant injecté. R : rayon de la bobine, N : nombre de spires, S : largeur des spires

Nous pouvons remarquer sur la Figure 4 - 41 que pour les deux bobines, au-delà de 400 mA, la température dépasse 40°C. Aussi, bien que des intensités de courant de 100 à 350 mA permettent de fonctionner sur des gammes de températures acceptables (20 à 35 °C), il faudra vérifier si ces intensités permettent de capturer efficacement les billes magnétiques. Si des intensités supérieures sont nécessaires pour la capture, la température du canal risque de dépasser la limite des 40 °C. De plus, l'échauffement global du dispositif dans le temps sur de longues heures d'utilisation et l'instabilité thermique de certains dispositifs nous a poussés à utiliser un module Peltier sous le dispositif. Cela permet d'assurer un refroidissement efficace lors de l'utilisation prolongée des bobines pour les immunodosages présentés dans la partie 3 et de stabiliser les performances de la bobine.

Par ailleurs, comme montré par les simulations présentées dans la partie 1 de chapitre, la géométrie de la bobine et les défauts de fabrication précités affectent également l'énergie thermique dissipée par effet Joule.

2.3. Caractérisation fluide des dispositifs

Comme expliqué dans la partie 1.2 de ce chapitre, les dispositifs sont encapsulés dans des canaux intégrant une chambre de détection dimensionnée à la taille des bobines utilisées. En parallèle des mesures thermiques précédentes, les dispositifs sont également évalués sur leur étanchéité fluide et notamment la résistance du collage par plasma O₂ du canal de PDMS sur la fine couche de PDMS encapsulant les bobines (voir Figure 4 - 42).

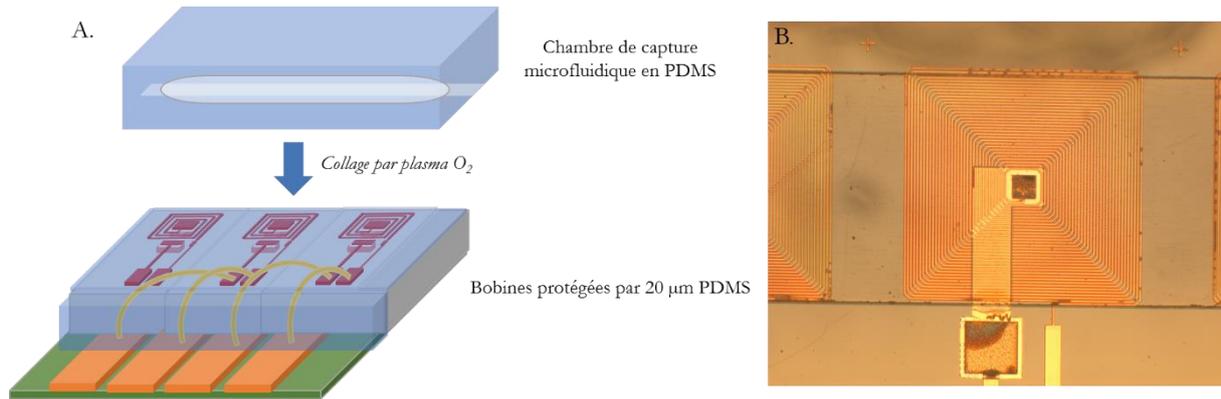


Figure 4 - 42. **A.** Schéma du collage par plasma O₂ de la chambre de capture microfluidique sur les bobines encapsulées ; **B.** Photographie d'une bobine encapsulée dans la chambre de capture (grossissement x5)

La petite taille des dispositifs limite la surface de collage des canaux sur une surface plane du PCB, nécessitant de découper les canaux sur de très petites surfaces (15x3 mm) ce qui peut parfois occasionner des défauts de collage. L'objectif ici est donc d'identifier les dispositifs présentant des fuites éventuelles à l'utilisation. Pour cela, les canaux ont été éprouvés sur la durée avec différentes pressions fluidiques correspondant à la gamme d'utilisation des dispositifs pour les expériences de greffage. Pour de faibles pressions (~ 10 mbar, 5 $\mu\text{L}/\text{min}$), les dispositifs ont été évalués sur plusieurs heures ; ce qui correspond aux conditions des réactions biologiques ayant lieu dans le canal. Pour de fortes pressions (200 mbar, débit hors gamme du débitmètre), les dispositifs ont été évalués sur une dizaine de minutes ; ce qui correspond aux conditions d'utilisation lors des rinçages intensifs des canaux entre deux réactions. La majorité des dispositifs testés ont montré une très bonne étanchéité selon les deux protocoles, permettant d'assurer une utilisation prolongée des dispositifs pour les réactions biologiques.

3. Application à la capture et à la détection fluorescente de billes magnétiques

Dans cette dernière partie, les dispositifs intégrant les microbobines et la chambre microfluidique de capture ont été appliqués à la capture sous flux de billes protéine G puis au greffage d'anticorps fluorescent en surface des billes, quantifiés par microscopie à fluorescence. Pour ces expériences, quelques dispositifs ont été sélectionnés parmi ceux ayant validé les trois tests caractéristiques présentés dans la partie 2. Les bobines utilisées dans cette partie présentent les caractéristiques suivantes :

- Bobine 1
Géométrique : $R = 750 \mu\text{m}$, $N = 20$, $L = 20 \mu\text{m}$
Électrique : $R = 1.73 \Omega$ $L = 0.37 \mu\text{H}$
- Bobine 2
Géométrique : $R = 750 \mu\text{m}$, $N = 25$, $L = 15 \mu\text{m}$
Électrique : $R = 8.16 \Omega$ $L = 0.73 \mu\text{H}$

Avant d'utiliser les billes en conditions fluidiques, il est nécessaire de vérifier leur affinité pour les anticorps fluorescents sélectionnés pour la quantification en microfluidique. Ensuite, les conditions de capture des billes par les microbobines sélectionnées seront évaluées. Enfin, les dispositifs seront utilisés pour étudier la réaction de greffage des anticorps fluorescents sur les billes capturées en conditions microfluidiques.

3.1. Greffage en tube des billes protéine G avec les anticorps fluorescents

Les billes protéine G sélectionnées dans le chapitre 3 (Pierce, ThermoScientific) sont d'abord préparées et évaluées pour un greffage d'anticorps FITC selon le protocole utilisé dans le chapitre 3 pour le greffage des IgG sur ce type de bille (voir Figure 4 - 43).

10 μL de billes (10 mg/mL) sont prélevées et placées dans un tube Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL. Les billes sont rincées à deux reprises avec 1 mL de PBS, Tween 20 (0.05%) et placées sur un support magnétique afin d'immobiliser les billes et de retirer le liquide de rinçage. Puis 500 μL d'anticorps anti-souris conjugués FITC (F0257, Sigma Aldrich) dilué à 1 :400 dans du PBS, Tween 20 (0.05%) sont ajoutés aux billes. Le tube est ensuite agité sur roue pendant 1h à 25°C. Les billes sont ensuite bloquées sur support magnétique et rincées à 3 reprises avec 500 μL de PBS, Tween 20 (0.05%).

Un échantillon de billes est prélevé et observé en microscopie à fluorescence (1000 ms, 475 nm) afin de vérifier le bon greffage des anticorps FITC sur les billes. La Figure 4 - 44 montre les images de microscopie des billes avant greffage (A), après greffage (B) et en lumière blanche (C). Nous pouvons observer que le signal fluorescent provient effectivement des billes. Par ailleurs l'intensité fluorescente mesurée est de 18.44 ± 0.38 u.a. au niveau des billes greffées contre 9.15 ± 0.07 u.a. pour les billes non greffées. Cela confirme le greffage des anticorps FITC sur les billes protéine G.

Avant de transposer ce protocole en microfluidique en s'appuyant sur la capacité de capture des microbobines, il a fallu au préalable déterminer les conditions de capture des billes, et plus particulièrement l'intensité de courant minimale à injecter afin de capturer suffisamment de billes pour le greffage des anticorps, le débit de capture des billes et la concentration des billes dans la solution à injecter.

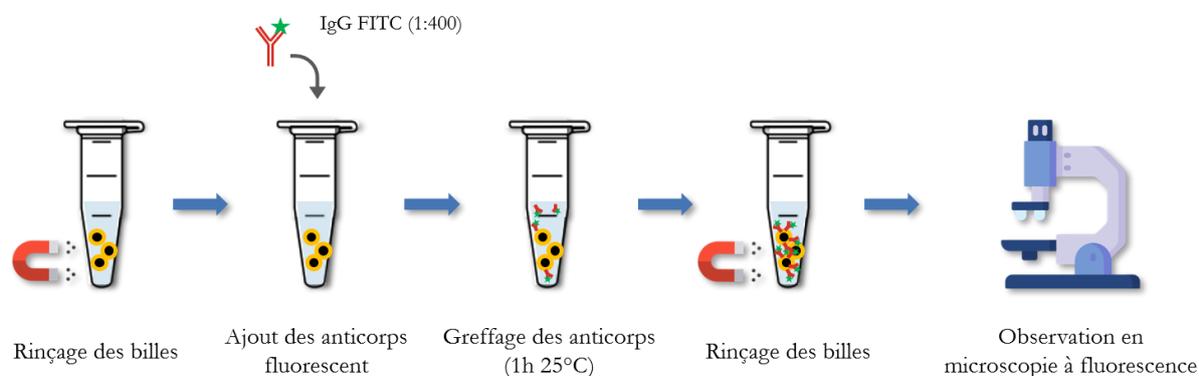


Figure 4 - 43. Schéma du protocole de greffage en tube des billes protéine G avec les anticorps FITC

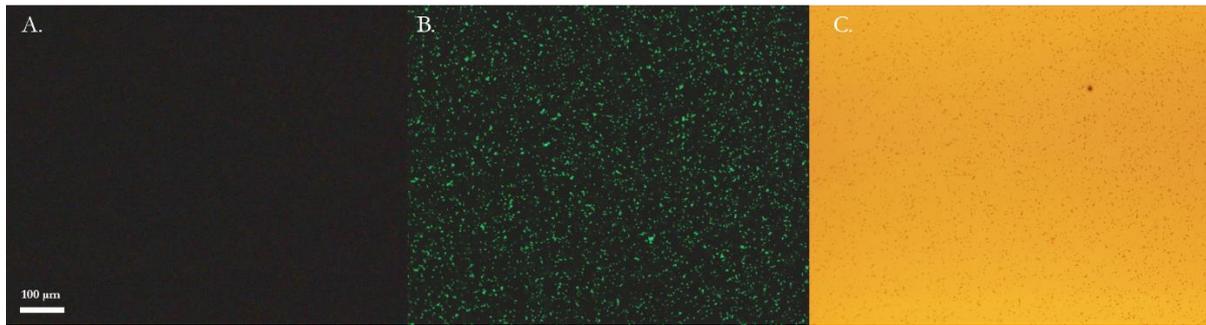


Figure 4 - 44. Images de microscopie des billes protéine G : **A.** à 475 nm, non greffées avec les anticorps FITC ; **B.** à 475 nm, greffées avec les anticorps FITC selon le protocole en tube **C.** en lumière blanche (x10, 1000 ms)

3.2. Evaluation des conditions de capture des billes par les microbobines

Afin de capturer une quantité suffisante de billes en un temps restreint pour limiter l'échauffement du dispositif et les temps d'expérimentation, les conditions de capture doivent être affinées. Pour cela, il s'agit de trouver un compromis entre le débit fluide d'injection des billes, la concentration des billes et la force magnétique générée par la microbobine sous tension.

En effet, le débit d'injection doit être suffisant pour que les billes soient déplacées dans le sens du fluide avant d'atteindre la zone de capture. Les billes protéine G ont un diamètre de $1\ \mu\text{m}$ et une densité de $2.0\ \text{g}/\text{cm}^3$. En cas de débit insuffisant, la sédimentation des billes dans le fond du canal est possible, empêchant le correct acheminement des billes jusque dans la chambre.

De même, comme expliqué dans la partie 1 de ce chapitre, un débit trop important occasionnerait une force de traînée qui dépasserait la force d'attraction magnétique créée par la bobine, empêchant l'immobilisation des billes au passage à proximité de la bobine. Il s'agit également, une fois les billes immobilisées, de garantir sa flottabilité et d'éviter qu'elles ne sédimentent au fond du canal au-dessus de la bobine.

Pour l'ensemble des expériences de cette partie, le montage utilisé est présenté sur la Figure 4 - 45. Les solutions sont acheminées par un contrôleur de pression microfluidique relié à un débitmètre permettant un contrôle précis des conditions d'injection des réactifs et des billes magnétiques. Une valve fluide permet l'arrêt de l'acheminement du fluide entre le contrôleur de pression et le débitmètre. Sans cette valve, lors du changement de solution à injecter, la coupure du débit provoque un reflux trop important arrachant les billes capturées par la bobine. L'intérieur du canal et la réponse fluorescente des billes greffées avec les anticorps sont observés à l'aide du microscope inversé. Les bobines sont alimentées en courant par un générateur. La température du dispositif est suivie *via* une thermistance intégrée au dispositif dont la résistance est proportionnelle à la température. La variation de la résistance est alors lue par l'impédancemètre connecté à la thermistance pour mesurer l'échauffement à la surface de la bobine. Le dispositif est refroidi si besoin et en conséquence pour limiter l'échauffement par un module Peltier placé à l'arrière du dispositif, sur la face arrière du PCB. Ce module Peltier est asservi en courant par un contrôleur qui applique une consigne en température et relève celle du module à l'aide d'une thermistance. La chaleur dégagée par le Peltier est enfin évacuée par un ventilateur alimenté par un générateur.

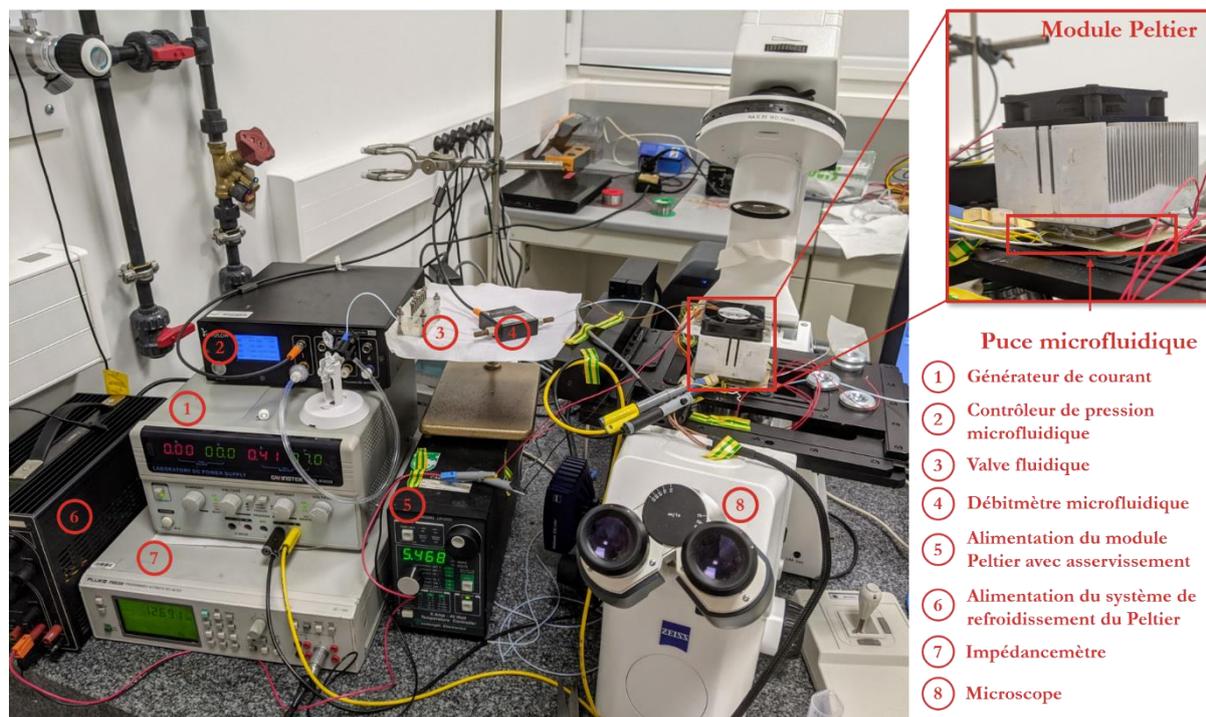


Figure 4 - 45. Photographie du montage des expériences de capture des billes magnétiques et greffage des anticorps fluorescents

Ainsi, la détermination des conditions de capture des billes a été réalisée en ajustant l'intensité du courant injecté pour garantir la capture de la majorité des billes tout en surveillant la température du dispositif. Le débit ici est alors restreint afin d'assurer une capture efficace des billes tout en les maintenant en mouvement. Un débit de $1 \mu\text{L}/\text{min}$ a été fixé à cette étape.

Si trop de billes sont perdues ou déportées dans le sens du flux, l'intensité du courant électrique injecté est ajustée tout en surveillant l'échauffement du dispositif avec la thermistance. Les conditions d'alimentation de la bobine sont évaluées pour chaque bobine car les résistances sont variables d'une bobine à l'autre, comme illustré dans la partie 2.1.

Enfin, une fois les billes capturées, le débit est augmenté petit à petit jusqu'à une valeur limite de $3 \mu\text{L}/\text{min}$ pour assurer un mélange efficace de la population de billes capturées ainsi qu'un acheminement des réactifs en un temps restreint. Au-delà de ce débit, la force de traînée exercée sur les billes est trop importante et trop de billes sont perdues.

Par ailleurs, la concentration initiale des billes dans solution commerciale est de $10 \text{ mg}/\text{mL}$. Cette concentration est trop importante pour assurer un bon greffage des billes lors des expériences avec les anticorps. De même, les billes doivent être suffisamment diluées pour ne pas saturer la bobine pendant la durée de l'expérience. La concentration de billes dans la solution injectée est donc sélectionnée à partir d'une valeur de référence correspondant au protocole de greffage dans les tubes ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$). Puis cette valeur a été adaptée à $33 \mu\text{g}/\text{mL}$ à partir des retours des observations en microscopie afin d'assurer la capture de suffisamment de billes en moins de 5 minutes.

La Figure 4 - 46 présente la chronologie de la capture des billes sur la bobine 1 sur les 10 premières minutes nécessaires à la stabilisation de la population de billes et du débit. Nous pouvons observer que la capture se fait préférentiellement au centre et sur les axes diagonaux de la bobine carrée, là où la densité de flux magnétique est la plus forte d'après les simulations présentées dans la partie 1. En effet, sur les angles des spires, la direction des fils de conduction change et donc le

gradient de courant augmente. Cela a pour conséquence d'augmenter la densité de flux magnétique générée par cette portion de fil. Ce profil de capture selon les axes et le centre de la bobine permet de définir la zone caractéristique de capture sur la bobine qu'il faudra retrouver dans chaque expérience. Cela permettra également de définir la zone d'intérêt pour la quantification de l'intensité fluorescente lors des expériences de greffage.

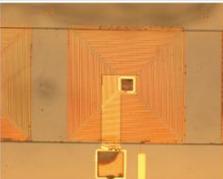
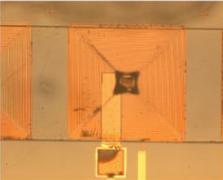
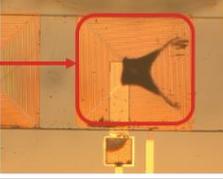
Observation en lumière blanche au microscope (x4)	Paramètres
Sens de circulation des billes 	 t = 0 min Débit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
	 t = 1 min Débit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
	 t = 2 min Débit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
	 t = 3 min Débit 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
Zone caractéristique de capture des billes 	 t = 10 min Débit 3 $\mu\text{L}/\text{min}$

Figure 4 - 46. Capture au cours du temps des billes magnétiques Protéine G par une microbobine alimentée avec 410 mA ($R = 750 \mu\text{m}$, $N = 25$, $L = 15 \mu\text{m}$)

Après plusieurs expérimentations, les paramètres retenus pour les expériences sont résumés dans le Tableau 4 - 5 ci-après. Une fois les conditions d'injection et de capture stabilisées, les conditions de greffage des anticorps FITC sur les billes ont pu être évaluées.

Tableau 4 - 5. Résumé des conditions expérimentales pour la capture des billes et le greffage des anticorps dans les dispositifs microfluidiques intégrant les microbobines

Etapes	Débit fluidique - pression	[Billes protéine G] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Solution/ solvant	Durée
Injection des billes	20 $\mu\text{L}/\text{min}$ -40 mbar	33 $\mu\text{g}/\text{mL}$	PBS, Tween 20 (0.05%)	10 min
Capture des billes	1 $\mu\text{L}/\text{min}$ - 3mbar			5 min
Stabilisation	3 $\mu\text{L}/\text{min}$ – 8 mbar			5 min

3.3. Évaluation de la durée de greffage des anticorps sur les billes immobilisées

Afin de déterminer la durée optimale de greffage des anticorps sur les billes protéine G, une étude en temps a été réalisée sur des billes protéine G immobilisées par la bobine 1 avec les caractéristiques suivantes : $R = 750 \mu\text{m}$, $N = 20$, $S = 20 \mu\text{m}$. Les conditions de capture sont fixées à partir de l'étude préliminaire de la partie 3.2 (voir Tableau 4 - 5).

La solution de billes est préparée en prélevant $33 \mu\text{L}$ de solution mère de billes et en les rinçant deux fois avec 1 mL de PBS, Tween 20 (0.05%). Les billes sont alors redispersées dans $1467 \mu\text{L}$ de PBs, Tween 20 (0.05%) et la solution est injectée dans le canal à un débit de $20 \mu\text{L}/\text{min}$ pendant 10 minutes pour acheminer les billes au niveau des bobines. Puis la bobine est excitée avec un courant de 620 mA (Tension $U = 3.4\text{V}$). La température mesurée au niveau du canal est de 20°C et est maintenue constante durant toute la durée de l'expérience grâce au module Peltier réglé pour une consigne de 7°C .

Les billes sont capturées à un débit de $1 \mu\text{L}/\text{min}$ pendant 3 minutes puis le débit est progressivement augmenté jusqu'à $3 \mu\text{L}/\text{min}$ pendant 2 minutes. La capture est stabilisée pendant 5 minutes puis la valve est fermée afin d'éviter un reflux de la solution à l'arrêt de la pression. La solution d'injection est changée pour une solution d'anticorps FITC (1 :400). Le débit est relancé et la vanne réouverte doucement pour ne pas risquer d'arracher les billes capturées par une surpression. La réaction est ensuite suivie dans le temps par microscopie à fluorescence. Les étapes sont schématisées sur la Figure 4 - 47

Sur la Figure 4 - 48, en comparant les images en lumière blanche et en fluorescence, nous pouvons observer que la majorité du signal fluorescent provient des billes immobilisées et que l'intensité du signal augmente au cours du temps. A partir de la Figure 4 - 49, nous constatons qu'au-delà de 30 minutes, l'intensité fluorescente se stabilise. Cela indique que la majorité des sites de greffages accessibles sur les billes par les anticorps semblent être occupés. Ainsi, pour la suite des expériences, le temps de réaction des billes avec les anticorps a donc été fixé à 30 minutes pour assurer une réponse maximale des billes tout en réduisant le temps d'expérimentation.

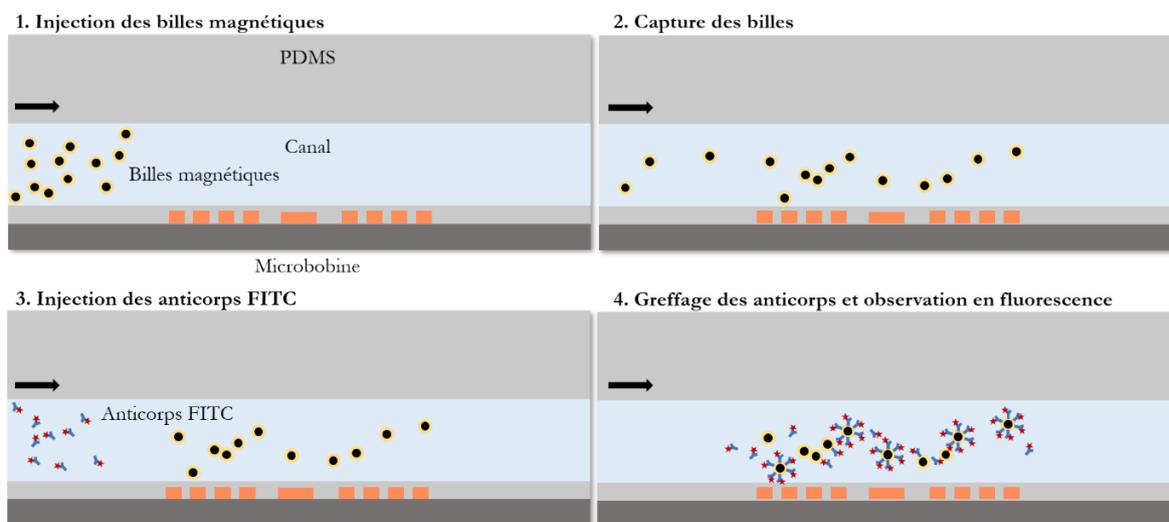


Figure 4 - 47. Schéma des étapes de capture et greffage des billes au sein du canal intégrant les microbobines

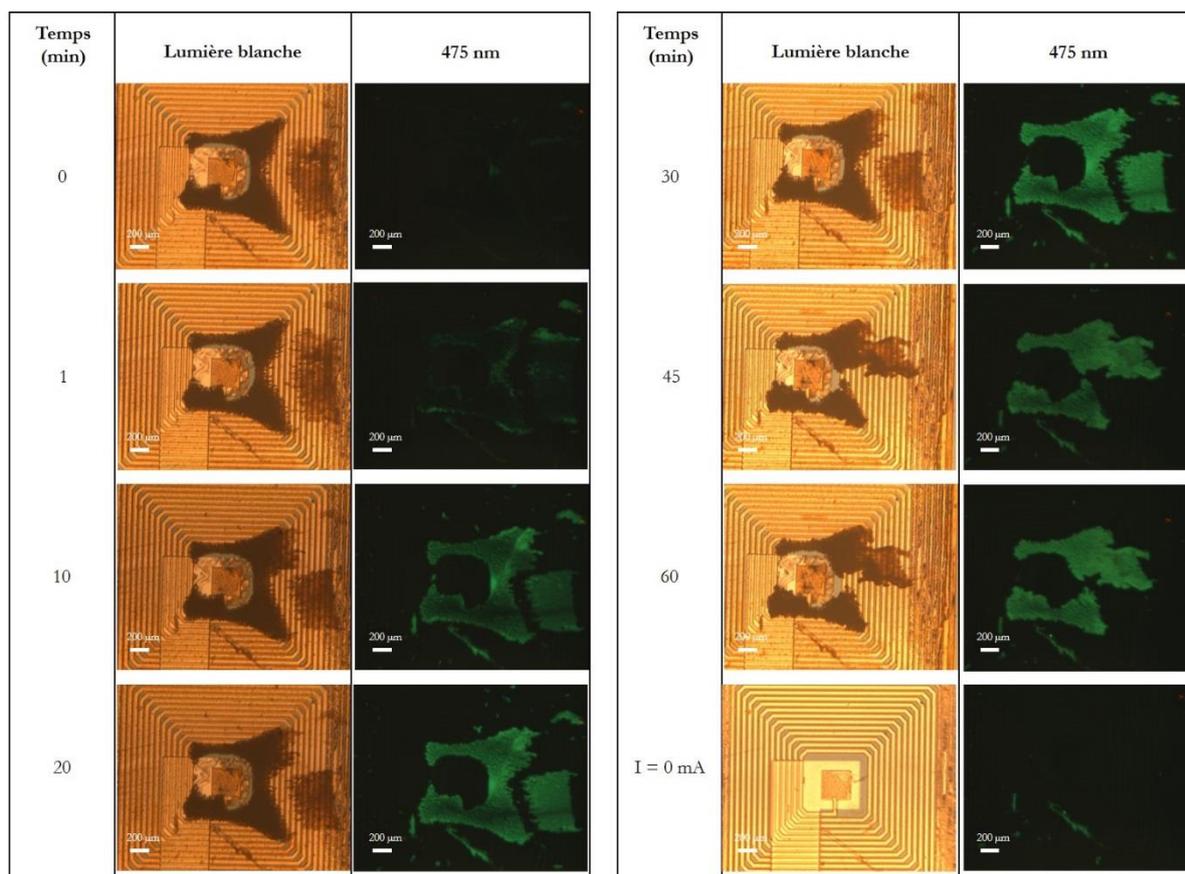


Figure 4 - 48. Photographies en lumière blanche et à 475 nm de la réaction de greffage des anticorps FITC (1 :400) sur des billes protéine G capturées par une microbobine ($R = 750 \mu\text{m}$, $N = 20$, $L = 20 \mu\text{m}$) et excitée à 620 mÅ. (Grossissement $\times 10$, 1000 ms)

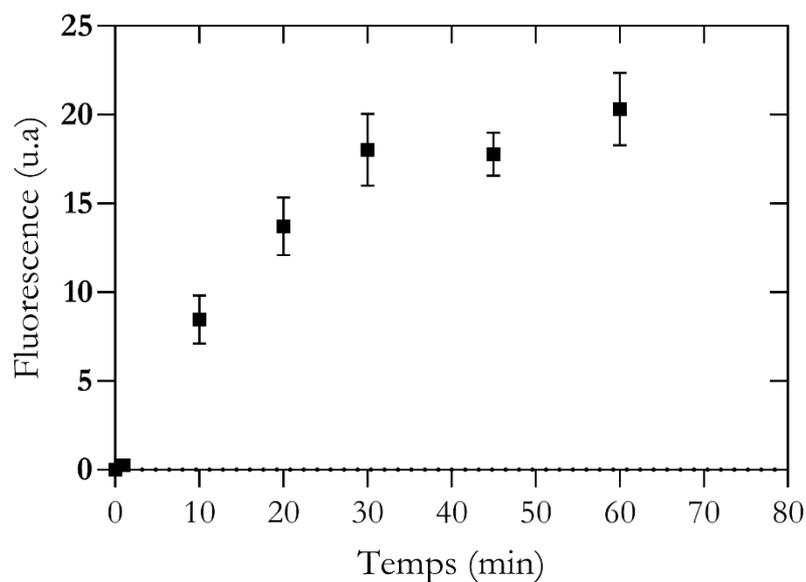


Figure 4 - 49. Évolution au cours du temps de l'intensité fluorescente d'une population de billes protéine G capturées par une microbobine en présence d'une solution d'anticorps FITC (1 :400)

3.4. Greffage et détection des anticorps fluorescents sur les billes immobilisées

A partir des conditions de capture et de greffage précédentes, une étude en concentration du greffage des anticorps FITC sur les billes protéine G a été menée. Chaque concentration est étudiée en triplicat afin d'évaluer la répétabilité de la capacité de capture des microbobines selon le protocole précédemment établi.

Les billes sont donc balayées par la solution d'anticorps pendant 30 minutes (dont 50 minutes servent à l'acheminement de la solution au niveau des billes à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$). Puis la réponse fluorescente est mesurée à l'aide du microscope. Entre chaque point de mesure, les canaux sont lavés pendant 15 minutes avec du PBS, Tween 20 (0.05%) à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, puis 5 minutes à 200 mbar (en dehors de la gamme de fonctionnement du débitmètre) avec de l'EDI et de l'isopropanol pour nettoyer tout résidu d'anticorps ou billes dans les canaux.

Afin de prendre en compte l'éventuelle adsorption non-spécifique des anticorps sur le PDMS, un protocole particulier de traitement d'image a été appliqué dans cette étude. La réponse fluorescente du PDMS hors de la zone de capture définie lors de l'étude préliminaire sur la Figure 4 - 46 a été quantifiée. Ce signal correspondant à la réponse non spécifique de la puce a été soustrait des acquisitions correspondant aux billes greffées pour chaque concentration étudiée.

Nous pouvons voir sur la Figure 4 - 50 que l'adsorption non spécifique est très limitée à faible concentration mais devient plus significative au-delà de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anticorps FITC. Néanmoins, la majorité de la réponse fluorescente reste issue des billes ; ce qui confirme la plus forte affinité des anticorps pour les billes plutôt que pour la surface de PDMS.

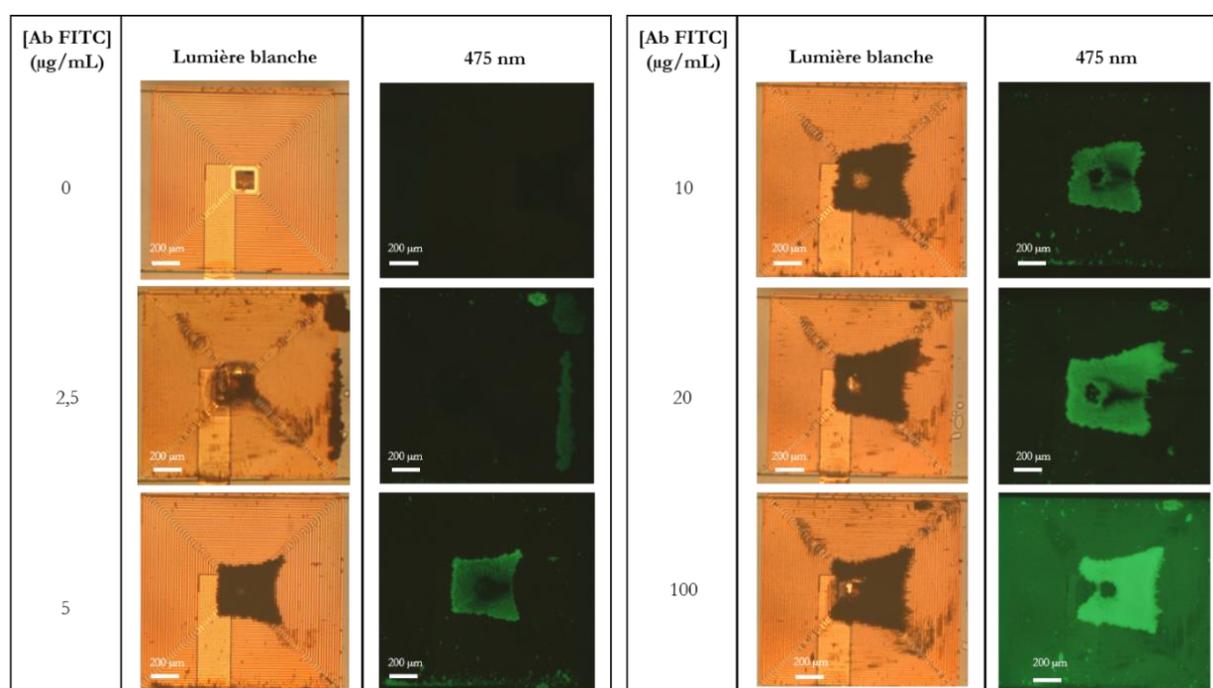


Figure 4 - 50. Photographies en lumière blanche et à 475 nm de la réaction de greffage des anticorps FITC à différentes concentrations sur des billes protéine G capturées par une microbobine ($R = 750 \mu\text{m}$, $N = 25$, $L = 15 \mu\text{m}$) pendant 30 minutes et excitée à 410 mÅ. (Grossissement x4, 1000 ms)

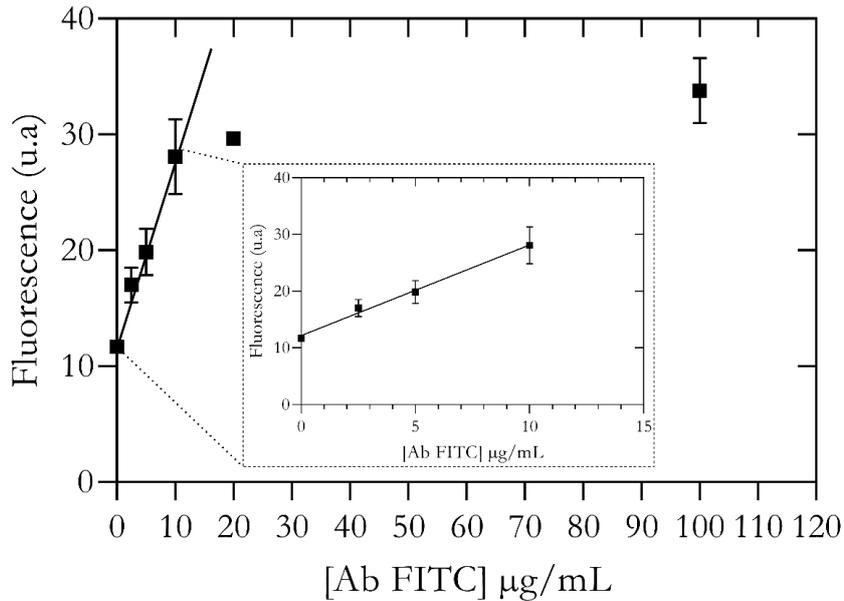


Figure 4 - 51. Evolution de la réponse fluorescente des billes protéine G capturées par une microbobine en fonction de la concentration en anticorps FITC

La Figure 4 - 51 représente la courbe correspondant à l'évolution de la réponse fluorescente issues des billes en fonction de la concentration en anticorps. Nous pouvons observer une première phase où la réponse évolue proportionnellement à la concentration en anticorps puis une phase de saturation au-delà de 10 µg/mL, où les sites de greffage accessibles sur les billes sont totalement occupés. Les anticorps ajoutés finissent par s'adsorber par défaut sur le PDMS, ce qu'on peut facilement observer sur la Figure 4 - 50. Par ailleurs, les faibles barres d'erreur des différents points de la courbe montrent la répétabilité de la capture des billes par la microbobine ainsi que l'efficacité de greffage des anticorps sur les billes.

La détermination de la limite de détection à partir de la droite de régression linéaire sur les points entre 0 et 10 µg/mL aboutit à une limite de détection de 1.1 µg/mL (7.3 nM) pour les anticorps FITC. Ainsi, cette dernière expérience valide l'application des microbobines et des billes protéine G pour le greffage spécifique des anticorps sur les billes et leur détection en fluorescence en un temps réduit et avec une consommation minimale de réactif apportée par la microfluidique. L'intégration des microbobines au sein du canal permet donc une manipulation et une capture contrôlée des billes magnétiques. Elle garantit la réalisation de réaction biochimique au sein même du canal et une quantification *in situ* par fluorescence.

Conclusion du chapitre 4

Dans ce chapitre, nous avons présenté le processus de fabrication de microbobines de capture de géométrie variable. Ce procédé a nécessité une optimisation de plusieurs étapes technologiques afin d'obtenir des dispositifs fonctionnels. Les performances électriques, thermiques et fluidiques des dispositifs fabriqués ont été caractérisées avec des résultats en accord avec les critères requis pour l'utilisation de billes magnétiques et d'espèces biologiques.

Une plateforme de caractérisation des dispositifs en conditions fluidiques a été élaborée pour l'application des microbobines à la capture des billes magnétiques protéine G à des températures entre 20 et 30°C. La capture des billes a été validée en conditions fluidiques avec de bonnes performances en termes de répétabilité et sensibilité.

Enfin, les microbobines ont permis de valider le greffage d'anticorps fluorescents à la surface des billes. Les conditions de capture et de greffage ont été optimisées afin d'aboutir à des performances stables et répétables. Une dépendance en temps et en concentration d'anticorps de la réponse fluorescente issue des billes greffées a été observée. Ces résultats ouvrent la voie pour la réalisation d'un immunodosage complet du TNF- α . Il consistera en la préparation des billes en conditions fluidiques puis la reconnaissance de l'antigène et la détection par deux couches d'anticorps, à l'image des expériences réalisées sur les surfaces de PDMS en conditions fluidiques.

Bibliographie

- [1] H.H. Cao, The fabrication process of microfluidic devices integrating microcoils for trapping magnetic nano particles for biological applications, Université Paris Saclay, 2016. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01350864>.
- [2] O. Lefebvre, Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques, Université Paris Saclay, 2018.
- [3] M. Woytasik, Etude des procédés de fabrication de microdispositifs électromagnétiques sur supports souples pour l'imagerie médicale (IRM) et le contrôle non destructif des matériaux, Orsay, 2005.
- [4] M. Couty, Etude du procédé de réalisation de micro-antennes souples implantables pour l'Imagerie médicale par Résonance Magnétique, Institut d'Electronique Fondamentale, 2013.
- [5] R. Fulcrand, D. Jugieu, C. Escriba, A. Bancaud, D. Bourrier, A. Boukabache, A.M. Gué, Development of a flexible microfluidic system integrating magnetic micro-actuators for trapping biological species, *J. Micromechanics Microengineering*. 19 (2009). doi:10.1088/0960-1317/19/10/105019.
- [6] R. Fulcrand, A. Bancaud, C. Escriba, Q. He, S. Charlot, A. Boukabache, A.M. Gué, On chip magnetic actuator for batch-mode dynamic manipulation of magnetic particles in compact lab-on-chip, *Sensors Actuators, B Chem.* 160 (2011) 1520–1528. doi:10.1016/j.snb.2011.08.011.
- [7] F. Braud, J. Torres, J. Mermet, M. Mouche, Ti-diffusion barrier in Cu-based metallization, 1995.
- [8] M. Cortes, J. Moulin, M. Couty, T. Peng, O. Garel, T.H.N. Dinh, Y. Zhu, M. Souadda, M. Woytasik, E. Lefebvre, Micromolding of NiFe and Ni Thick Films for 3D Integration of MEMS, *J. Electrochem. Soc.* 161 (2014) B3038–B3043. doi:10.1149/2.006402jes.
- [9] J.-M. Quemper, S. Nicolas, J.P. Gilles, J.P. Grandchamp, A. Bosseboeuf, T. Bourouina, E. Dufour-Gergam, Permalloy electroplating through photoresist molds, *Sensors and Actuators*. 74 (1999) 1999–2000.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Dans la perspective de la fabrication d'un immunocapteur sous forme de patch pour l'analyse des cytokines dans la sueur appliquée au suivi des troubles inflammatoires, ces travaux de thèse ont porté sur le développement de différents éléments du capteur.

Plus particulièrement, ce manuscrit rapporte la conception d'un dispositif intégrant des fonctions fluidiques et magnétiques pour l'immunodosage du TNF- α à l'aide de billes magnétiques détectées en microscopie à fluorescence.

Le **chapitre 1** a notamment permis de comprendre les enjeux liés au suivi des troubles inflammatoires et l'intérêt d'étudier les concentrations en cytokines dans le corps humain. Leur présence dans la sueur rend possible un suivi non invasif et en continu de l'activité inflammatoire à l'aide d'un biocapteur sous forme de patch. La conception d'un tel biocapteur a donc été discutée, en intégrant les différents critères de performance nécessaires à la détection des cytokines. Pour cela, le choix du matériau constitutif du capteur, de la méthode de transduction et d'immobilisation des biorécepteurs est essentiel. Enfin, l'intégration de billes magnétiques pour améliorer les performances des analyses biochimiques a été abordée, impliquant le développement d'un dispositif de manipulation magnétique des billes au sein du capteur. Différentes stratégies ont été évoquées.

A partir de cette analyse de l'état de l'art des immunocapteurs pour les cytokines, nous avons présenté dans le **chapitre 2** le développement d'un protocole de silanisation du PDMS par l'APTES. L'étude a initialement porté sur des surfaces de PDMS en pleine plaque afin de permettre une caractérisation approfondie des propriétés de surface du matériau modifié. Différentes techniques ont été utilisées : l'angle de contact pour l'étude de la mouillabilité, la spectroscopie EDX pour l'étude de la composition élémentaire, la spectroscopie FTIR pour l'étude des fonctions chimiques en surface, la microscopie AFM pour l'étude de la rugosité, la microscopie à fluorescence pour l'étude de la réactivité des groupements amines obtenus en surface. Cette étude a permis d'aboutir à des conditions de silanisation reproductibles et stables avec 20% d'APTES dans l'éthanol et 30 minutes de réaction dans un environnement contrôlé en humidité. Les surfaces de PDMS obtenues ont montré des caractéristiques en accord avec une fonctionnalisation contrôlée, sans signe d'agrégation, et permettant le greffage covalent d'anticorps. Les performances des surfaces ont été évaluées pour l'immunodosage du TNF- α avec un immuno-sandwich d'anticorps détecté en fluorescence. Une limite de détection de 0.55 $\mu\text{g/mL}$ (31.6 nM) a été obtenue. Les surfaces ont ensuite été intégrées dans une puce microfluidique afin de réaliser un immunodosage sous flux du TNF- α . Cette intégration a notamment nécessité l'optimisation des conditions de greffage et de détection des anticorps, ainsi que le développement d'un protocole de passivation des surfaces de PDMS afin d'éviter l'adsorption non spécifique des protéines dans le canal. Les performances des puces modifiées ont été comparées à des puces de PDMS natif non modifié, et une immobilisation stable et reproductible a clairement été démontrée dans le cas des puces modifiées. Une limite de détection de 0.22 $\mu\text{g/mL}$ (12.64 nM) a été obtenue pour l'immunodosage du TNF- α en fluorescence, confirmant que l'intégration microfluidique permet une amélioration de la sensibilité, de la reproductibilité et de la rapidité de la détection.

Dans le **chapitre 3**, une étude approfondie des différentes billes magnétiques utilisées pour le greffage d'anticorps a été menée afin de déterminer le meilleur type de billes pour le greffage des anticorps anti-TNF- α pour la capture de la cytokine au sein du biocapteur. Différentes études ayant tenté de développer des méthodes de caractérisation du greffage d'anticorps sur des surfaces, et

notamment des billes, ont été présentées. Peu de travaux font état d'analyse du recouvrement des anticorps sur la surface et de la détermination de leur orientation. Ainsi, nous avons présenté une méthode analytique reposant sur une digestion enzymatique spécifique des anticorps par l'*IdeS* et l'analyse des fragments de digestion par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en conditions non dénaturantes. Cette méthode a notamment permis d'élucider les performances de 4 types de billes commerciales en termes de recouvrement et orientation des anticorps à leur surface. Parmi elle, les billes magnétiques protéine G ont démontré les meilleures performances avec plus de 75% des anticorps spécifiquement orientés pour une capture du TNF- α et plus de 70 000 molécules immobilisées par billes. Les billes étudiées ont ensuite été évaluées pour la capture du TNF- α en solution et son élution, validant les meilleures performances des billes protéine G avec 67.5% de TNF- α élués.

Enfin, dans le **chapitre 4**, la fabrication d'un dispositif de manipulation des billes magnétiques sélectionnées a été abordée. Nous avons d'abord brièvement rappelé les résultats importants des études précédemment menées dans cette optique afin de comprendre les paramètres nécessaires à la conception des bobines et à l'évaluation de leur performance. Les critères retenus sont l'intensité du champ magnétique généré par la bobine pour une intensité de courant donnée, ainsi que la minimisation de l'échauffement par effet Joule de la bobine pour garantir l'intégrité du dispositif et des réactions biologiques dans le canal à proximité de la bobine. Un procédé de microfabrication en salle blanche de microbobines à 3 niveaux a été présenté. Ce procédé a notamment nécessité l'optimisation de différentes étapes technologiques afin de garantir l'intégrité de la structure des bobines et éviter un échauffement trop important en cas de défaut de conception. Par ailleurs, un protocole de fabrication intégrant un substrat de Permalloy sous les bobines a été proposé afin d'optimiser les performances des bobines en concentrant les lignes de champ magnétique généré. Les microbobines fabriquées ont été associées à une chambre microfluidique pour permettre la capture des billes magnétiques injectées. Les dispositifs magnéto-fluidiques ont alors été caractérisés d'un point de vue électrique, thermique et fluide pour assurer le bon fonctionnement des bobines, un échauffement contrôlé (<40°C) du dispositif et l'étanchéité du canal microfluidique. Ils ont enfin été appliqués à la capture de billes magnétiques protéine G en conditions fluidiques. Les conditions de capture ont été optimisées afin de garantir une capture efficace des billes en un temps réduit et avec un échauffement minimal de l'intérieur du canal. Les billes capturées ont ensuite été greffées avec des anticorps fluorescents en conditions fluidiques. Les conditions de greffage et de détection ont été affinées et une limite de détection de 1.1 $\mu\text{g/mL}$ (7.3 nM) a été obtenue en fluorescence pour le greffage d'anticorps FITC en surface des billes en moins de 30 minutes.

Perspectives

Nous avons mentionné dans le chapitre 4 la réalisation d'un dispositif intégrant un substrat de Permalloy sous les microbobines afin d'optimiser les performances du dispositif de manipulation magnétique. Cette piste pourrait être approfondie car il n'a pas été possible de finaliser l'étude de ces dispositifs dans les délais du manuscrit du fait d'installations en maintenance en salle blanche. Le protocole de réalisation de ces bobines pourrait également être amélioré en optimisant la répartition des motifs sur le masque afin de minimiser les effets de bords après le dépôt électrolytique de Permalloy, occasionnant des défauts d'alignements dans les étapes de lithographie ultérieures.

Concernant l'optimisation des réactions dans la chambre de capture, il serait également intéressant d'optimiser le mélange des billes capturées. Les microbobines étant arrangées en lot de 3 bobines, elles peuvent être activées alternativement pour permettre un mélange des billes au sein de la chambre lors des étapes de greffage et de capture des éléments biologiques.

De plus, le chapitre 4 s'achève sur la validation du greffage d'une couche d'anticorps fluorescents à la surface des billes. Il serait intéressant de réaliser un immunodosage complet sur les billes capturées au sein de la chambre afin de valider le bon greffage de l'immunocomplexe de TNF- α en conditions fluidiques et détecté en fluorescence. Les différentes étapes de greffage et de détection pourraient également être optimisées pour réduire au maximum les temps d'incubation et de détection pour assurer une expérience rapide.

Enfin, au-delà de la chambre de capture, les travaux des chapitres 2 et 4 pourraient être assemblés en déportant les billes greffées, et ayant capturé le TNF- α , dans une seconde chambre de détection. Cette seconde chambre intégrerait une surface de PDMS silanisée et greffée avec des anticorps anti-TNF- α pour permettre l'immobilisation des immunocomplexes sur billes à la surface. Cette immobilisation pourrait éventuellement être assistée par l'intermédiaire de microbobines pour faciliter le greffage des complexes à la surface du canal. Une fois immobilisés, les immunocomplexes seraient détectés en microscopie à fluorescence.

A terme, cette détection ne serait plus fluorescente et serait assurée par un capteur magnétique reposant sur des microbobines de détection. Cela améliorerait la sensibilité de la détection et éviterait certains inconvénients liés à la fluorescence (diffraction, diffusion, auto-fluorescence). Des limites de détection plus basses pourraient ainsi être atteintes pour le TNF- α . La détection magnétique garantirait aussi une intégration du capteur dans le dispositif microfluidique reposant sur la même technologie de microbobines et de circuits magnétiques à base de Permalloy [1].

A plus long terme, il est aussi possible d'étendre l'analyse à d'autres cytokines afin de réaliser des analyses multiplexes avec différents anticorps anti-cytokines. Il serait par exemple intéressant d'intégrer les interleukines IL-6 et IL-1 β aux analyses, car elles sont souvent associées au TNF- α dans les troubles inflammatoires présentés. Des tests dans de la sueur artificielle et humaine pourraient également être réalisés pour mesurer l'impact de la matrice d'analyse sur les performances du capteur.

Au-delà, l'objectif reste évidemment la conception d'un biocapteur sous forme de patch intégrant des fonctions de capture et de détection des billes avec une chambre de capture pour la préparation des billes et la capture des cytokines à l'aide des microbobines ; puis une seconde chambre de détection silanisée permettant la quantification des complexes magnétiques à l'aide de bobines de détection. Des limites de détection de l'ordre du pg/mL devront être atteintes afin de valider l'utilisation appliquée au suivi des pathologies inflammatoires.

- [1] O. Lefebvre, Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques, Université Paris Saclay, 2018.

ANNEXES

Sommaire

Références produits	258
Annexes Chapitre 2.....	259
1. Préparation du mélange de PDMS.....	259
2. Principes des techniques de caractérisation.....	259
2.1. L'angle de contact.....	259
2.2. La spectroscopie des rayons X à dispersion en énergie (EDX).....	260
2.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	262
2.4. La microscopie à force atomique.....	262
2.5. La microscopie optique à fluorescence.....	263
3. Silanisation des couches de PDMS par l'APTES	268
4. Greffage et détection des IgG de souris sur les couches de PDMS silanisées.....	269
5. Immunodosage du TNF-α sur les couches de PDMS silanisées en pleine plaque.	270
6. Passivation du PDMS par le PEO (protocole Ha Hong Cao).....	271
7. Protocole de passivation des puces et greffage des anticorps sous flux.....	272
8. Protocole optimisé de passivation des surfaces de PDMS	273
9. Protocole optimisé de passivation des puces et greffage d'anticorps sous flux.....	274
10. Protocole de greffage d'IgG en conditions fluidiques et détection par fluorescence	275
11. Protocole d'immunodosage du TNF-α en conditions fluidiques	276
Annexes Chapitre 3.....	277
1. Protocoles de greffage des billes magnétiques.....	277
1.1. Protocole de greffage des billes Dynabeads COOH.....	277
1.2. Protocole de greffage des billes Dynabeads Ts.....	277
1.3. Protocole de greffage des billes Dynabeads Streptavidin.....	277
1.4. Protocole de greffage des billes Pierce Protein G.....	278
2. Principe de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	278
3. Procédure d'immunodosage sur billes Ts.....	279
Annexes Chapitre 4.....	280
1. Procédé de fabrication des microbobines de capture	280
1.1. Nettoyage et oxydation des substrats de silicium.....	280
1.2. Lift-off des sous-pistes de cuivre.....	280

1.3.	Dépôt de la couche de diélectrique pour l'isolation des sous-pistes de cuivre et gravure	280
1.4.	Micromoulage des microbobines de cuivre.....	281
1.5.	Elimination de la couche d'accroche de Ti/Cu.....	282
1.6.	Microsoudure à l'or.....	282
1.7.	Micromoulage des bases de Permalloy (Fe ₂₀ Ni ₈₀).....	282
	Bibliographie.....	284

Références produits

Substrats

Wafers Si 2 pouces et 4 pouces non dopés (BT Electronics)

Chimie

APTES 99% (Sigma Aldrich)

Bovine Serum Albumin (Sigma Aldrich)

EDC/S-NHS (Sigma Aldrich)

Ethanol 99%, acétone, isopropanol VLSI (Technic France)

Fluorescamine >98% TLC (Sigma Aldrich)

PBS 10X (Sigma Aldrich)

PEO (Mw 400,000, Sigma Aldrich)

PDMS Sylgard 184 (Dow Corning)

Tris-HCl 10X (Sigma Aldrich)

Tween 20 (Sigma Aldrich)

Biologie

Anti-chèvre IgG (Fc specific)-FITC (SAB37000258 Sigma Aldrich)

Anticorps monoclonaux de souris anti-TNF- α humain (clone 1C3-A1-F4) (Sigma Aldrich WH0007124M2-100UG)

Anticorps polyclonaux de chèvre anti-TNF- α humain (T0813 Sigma Aldrich)

Anticorps polyclonaux de chèvre anti-TNF- α porcin (T1816 Sigma Aldrich)

Anti-souris IgG (whole molecule)-FITC (F0257-2ML Sigma Aldrich)

Billes magnétiques Dynabeads MyOne Tosylactivated, Carboxylated, Streptavidin (Thermofischer)

Billes magnétiques Pierce Protein G 1 μ m (Thermofischer)

Invitrogen TNF alpha Human Uncoated ELISA Kit (Thermofischer)

Mouse IgG (I5381 Sigma Aldrich)

Recombinant Tumor Necrosis Factor α humain (GF314 Merck)

Annexes Chapitre 2

1. Préparation du mélange de PDMS

Le PDMS utilisé tout au long de cette thèse est fabriqué par Dow Corning. Il s'agit de kit Sylgard 184, composé d'un élastomère et d'un réticulant. Le mélange est préparé comme suit :

- i. L'élastomère et le réticulant sont pesés sur une balance dans un ratio 1:10 (réticulant:élastomère).
- ii. Le mélange est réalisé dans un speedmixer à 2400 rpm pendant 30 secondes afin de disperser le réticulant liquide dans l'élastomère plus visqueux.
- iii. Le mélange est ensuite dégazé si nécessaire sous une cloche à vide pendant 15 à 30 minutes en fonction du volume préparé.
- iv. Le tout est ensuite coulé sur un moule en SU8 pour la préparation des puces microfluidiques (voir partie III) ou enrésiné sur une surface pour la préparation de fines couches de PDMS.
- v. L'ensemble est ensuite recuit à l'étuve à 75°C pendant 1h (2h pour un moule en SU8 épais).

2. Principes des techniques de caractérisation

2.1. L'angle de contact

La mesure d'angle de contact est une technique permettant de caractériser la mouillabilité d'une surface. On dit qu'un liquide "mouille" une surface s'il s'étale totalement sur celle-ci. A contrario, un liquide ne mouille pas s'il ne s'étale pas et forme des gouttes à sa surface. Le mouillage désigne donc à la fois la forme que prend le liquide à la surface du solide (on parle de mouillage statique) et d'autre part le comportement du liquide quand on essaye de le faire couler (mouillage dynamique). Ces comportements sont dictés par les interactions moléculaires entre le liquide, le solide et le gaz à l'interface des trois phases. La grandeur représentant ces interactions à l'échelle macroscopique est l'énergie de surface (ou tension de surface) γ . Elle intervient à l'interface solide-liquide (γ_{SL}), solide-vapeur (γ_{SV}) et liquide-vapeur (γ_{LV}) autour de la goutte (voir Figure 3). L'angle de contact Θ correspond à l'angle qui minimise les énergies de surface entre les différentes interfaces. Il est donné par la relation d'Young : $\cos\theta = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}}$. Un matériau dont l'angle de contact est supérieur à 90° est dit "hydrophobe" car il "craint" l'eau et ne mouille pas ; inversement un matériau dont l'angle de contact est inférieur à 90° est "hydrophile", il "aime" l'eau et mouille davantage.

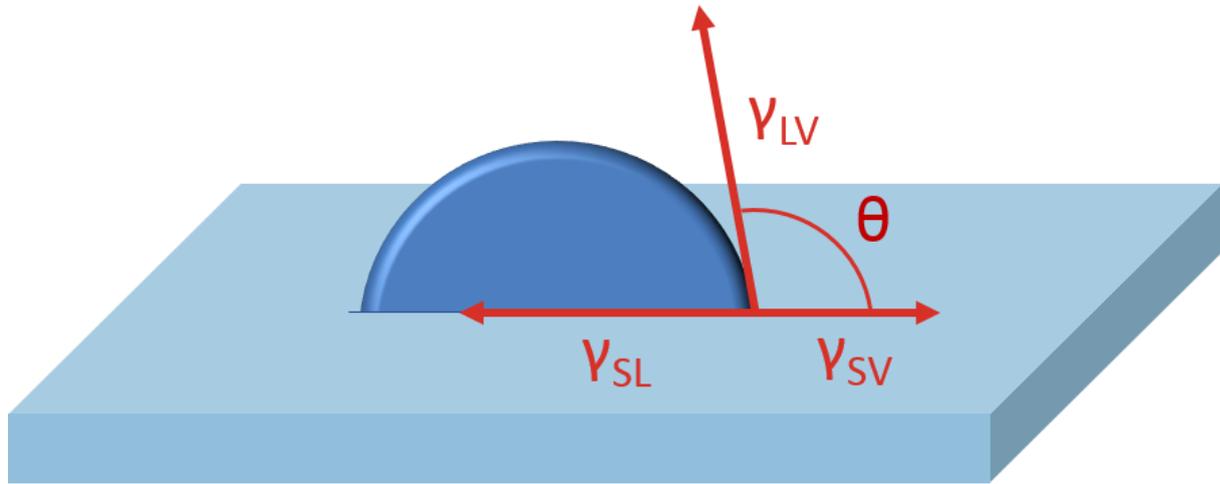


Figure 1. Schéma du principe de mesure de l'angle de contact d'une goutte étalée sur une surface solide. γ_{SL} , γ_{SV} , γ_{LV} représentent respectivement l'énergie de surface à l'interface solide-liquide, solide-vapeur et liquide-vapeur. Θ représente l'angle de contact de la goutte avec la surface

La mesure d'angle de contact est une méthode très rapide et facile à mettre en œuvre pour examiner les propriétés de surface. Dans le cadre de cette thèse, les mesures d'angle de contact sont réalisées en salle blanche, à température ambiante, sur un goniomètre Dataphysics OCA20. L'échantillon à analyser est placé sur un porte-échantillon horizontal pouvant être déplacé selon les 3 axes X, Y et Z. Une aiguille reliée à une seringue est fixée à la verticale du porte échantillon et est remplie d'eau déionisée. Une goutte de 1 μL est formée à l'extrémité de l'aiguille à une vitesse de 0.5 $\mu\text{L/s}$. L'échantillon est ensuite délicatement amené en contact avec la goutte puis retiré afin de dissocier la goutte de l'aiguille et d'observer la forme prise par la goutte sur la surface. Une caméra CCD placée sur le côté de la goutte permet d'observer le profil formé sur la surface.

2.2. La spectroscopie des rayons X à dispersion en énergie (EDX)

L'EDX est une technique d'analyse élémentaire reposant sur une installation de microscopie électronique à balayage (MEB). Elle se base sur la génération de rayons X caractéristiques des atomes présents dans un échantillon soumis à un faisceau d'électrons. Ce faisceau d'électrons est généré par l'appareillage du microscope électronique à balayage (MEB) traditionnellement utilisé pour l'observation d'échantillons microscopiques conducteurs (ou rendus conducteurs par métallisation). Généralement, le filament de la sonde du MEB est soumis à une tension ajustable (entre 1 et 20 kV) afin de générer des électrons qui sont accélérés vers l'échantillon à observer. Après l'impact de l'électron sur l'échantillon, deux événements physiques se produisent : la diffusion élastique et la diffusion inélastique. La première correspond à un changement de direction de l'électron sans perte notable d'énergie, généralement occasionné par des interactions avec le noyau des atomes de l'échantillon. En revanche, la diffusion inélastique correspond à une perte d'énergie sans changement notable de direction de l'électron, généralement occasionné par une interaction avec le noyau et le nuage d'électrons des atomes. Suites à ces interactions, les atomes

sont ionisés et retrouvent leur état d'origine en émettant des photons (ici des rayons X) dont l'énergie correspond à la différence d'énergie potentielle entre les deux orbitales atomiques impliquées dans la transition électronique issue de l'impact de l'électron incident. Cette énergie est donc caractéristique de l'élément ionisé car les niveaux énergétiques des orbitales dépendent du numéro atomique de l'atome.

Une sonde capable de détecter ces rayons X permet de déterminer les éléments présents dans l'échantillon. Elle permet une analyse simultanée des rayons X d'énergie variable et cette analyse est représentée sous forme de spectre, avec en abscisse l'énergie des photons détectés et en ordonnée le compte de rayons X reçus par énergie. On parle alors d'analyse semi-quantitative et semi-qualitative car on obtient des informations sur les énergies des éléments présents et leur proportion relative par rapport à l'air du pic tracé sur le spectre. L'analyse est faite sous un vide modéré ($\sim 10^{-5}$ mbar) afin de limiter la contamination de l'échantillon et l'absorption des rayons X par les molécules présentes dans l'air.

Néanmoins, l'EDX peine à distinguer les éléments de faible numéro atomique ($Z < 10$). La limite de détection dépend essentiellement du nombre de coups reçus et donc du temps d'analyse et/ou de la tension d'observation. L'opérateur aura donc à faire un choix judicieux de ces paramètres afin de garantir la qualité de l'analyse. Par ailleurs, l'énergie choisie et l'angle d'observation auront également une influence sur la diffusion des électrons dans l'échantillon. On parle de "cône de diffusion" pour décrire le volume d'interaction où les électrons incidents interagissent avec les atomes du matériau analysé. Plus la tension d'observation est grande, plus ce cône sera grand. De même, l'angle d'observation permettra de faire varier la forme du "cône de diffusion". Un angle d'observation rasant permettra de sonder davantage les éléments en surface du matériau, tandis qu'un angle quasi normal à la surface, sonde davantage le volume de l'échantillon. Nous avons d'ailleurs tiré parti de ce phénomène dans les mesures effectués sur le PDMS dans la partie II.

L'EDX permet ainsi l'analyse d'un matériau sur un à plusieurs microns de profondeur. Enfin, l'influence du logiciel d'acquisition et des modèles théoriques d'attribution est à prendre en compte. L'EDX est généralement appliqué à des matériaux inorganiques cristallins ou semi-cristallins, dont les structures sont déjà bien élucidées. L'attribution des éléments et de leur proportion est donc basée sur ces modèles théoriques, mais ne correspond pas toujours à la réalité de la structure des matériaux moins conventionnels comme les polymères et les éléments biologiques. Dans le cadre de notre étude, nous nous affranchissons du modèle théorique en ne considérant que le nombre de coups nets calculés par le logiciel et non pas la proportion atomique relative calculée selon les modèles inorganiques.

L'appareil utilisé pour ces analyses au laboratoire est un microscope électronique à balayage Hitachi S-3600N équipé d'une sonde à rayons X refroidie à l'azote liquide. L'échantillon est introduit dans la chambre du MEB et l'image est d'abord ajustée afin de focaliser le faisceau d'électron à la surface de l'échantillon. La sonde est introduite dans l'enceinte et forme un angle de 30° avec la surface de l'échantillon. Pour l'analyse du PDMS, la tension d'observation varie de 3 à 5 kV avec un biais de correction pour les faibles énergies ("Low Acceleration Bias). Le temps d'acquisition est fixé à 1 minute et la constante de temps à 50. Le logiciel d'acquisition est Noran

System Six. La Figure 4 du chapitre 2 montre des exemples de spectres EDX obtenues ainsi que les données fournies par le logiciel.

Le choix de l'EDX par rapport à la spectrométrie photoélectronique X (XPS), très utilisée pour l'analyse de surface du PDMS, notamment pour sa grande sensibilité, s'explique par les conditions drastiques d'analyse pour les mesures XPS. Les conditions d'ultravide ($\sim 10^{-9}$ mbar) peuvent provoquer le dégazage du polymère [1] et polluer l'enceinte, ainsi que endommager éventuellement la surface [2] en provoquant par exemple la désorption d'espèces faiblement liées. De même, la préparation de l'échantillon est beaucoup plus stricte afin d'éviter toute contamination. Enfin, les temps d'acquisition peuvent atteindre plusieurs heures afin d'obtenir les informations souhaitées, contre quelques minutes en EDX. Aussi, dans le cadre de notre étude, l'XPS n'a pas été envisagé pour l'ensemble des contraintes précitées, limitant le développement d'un protocole de "routine" pour la caractérisation rapide des échantillons de PDMS fonctionnalisés.

2.3. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge est une technique permettant d'identifier les liaisons chimiques caractéristiques d'un échantillon donné. Elle peut être appliquée sur des liquides (dans des cuves en quartz), des poudres, des surfaces et même des gaz. Elle repose sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par les liaisons d'une molécule donnée lorsque l'énergie de ce rayonnement correspond à l'énergie de vibration de la liaison chimique. La majorité des liaisons chimiques vibrent dans le domaine de l'infrarouge moyen, entre 400 et 4000 cm^{-1} (2.5 à $25\text{ }\mu\text{m}$). Lorsque la molécule absorbe le rayonnement infrarouge incident, certaines liaisons vibreront à des fréquences bien définies, dépendant essentiellement de la masse des atomes composant la liaison, de la force de la liaison et de l'environnement de la molécule. Les vibrations se manifestent sous forme d'élongations (mouvement dans l'axe de la liaison) et ou de déformations (l'angle entre deux liaisons adjacentes est modifié, dans le plan ou hors du plan), toutes deux symétriques ou asymétriques.

Le faisceau infrarouge est formé par un système interférométrique de type Michelson, afin de produire un spectre de longueurs d'ondes données. En modulant les positions des miroirs de l'interféromètre, l'appareil peut alors balayer l'ensemble des longueurs d'ondes à étudier en un temps réduit et sur une gamme de longueurs d'ondes plus larges qu'un spectromètre classique produisant une unique longueur d'onde par balayage. Le signal produit par le FTIR et les informations renvoyées par l'échantillon nécessitent d'être traitées par un ordinateur qui applique une transformée de Fourier afin de retrouver la réponse de l'échantillon en fonction de chaque longueur d'onde émise par l'appareil. On obtient alors un spectre en transmittance ou absorbance en fonction du nombre d'onde $1/\lambda$.

2.4. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique est une technique d'analyse topographique de surface reposant sur le balayage d'une surface avec une pointe fine. Il permet de sonder des échelles dimensionnelles bien plus faibles que la microscopie optique limitée par la diffraction de la lumière lorsque les dimensions des objets atteignent celle de la longueur d'onde utilisée pour l'observation

(sous la centaine de nanomètres). Pour l'AFM, l'analyse peut descendre à l'échelle de quelques nanomètres et monter jusqu'à quelques microns.

La pointe est reliée à un levier flexible qui se déforme en fonction de la nature des interactions (attractives ou répulsives) entre les atomes de la pointe et ceux constituant la surface de l'échantillon. Cette déformation du levier est alors régie par la loi de Hooke. A l'aide d'un laser, la déformation est mesurée et analysée en chaque point que balaye la pointe sur l'échantillon, ce qui permet de remonter à la topographie de la surface.

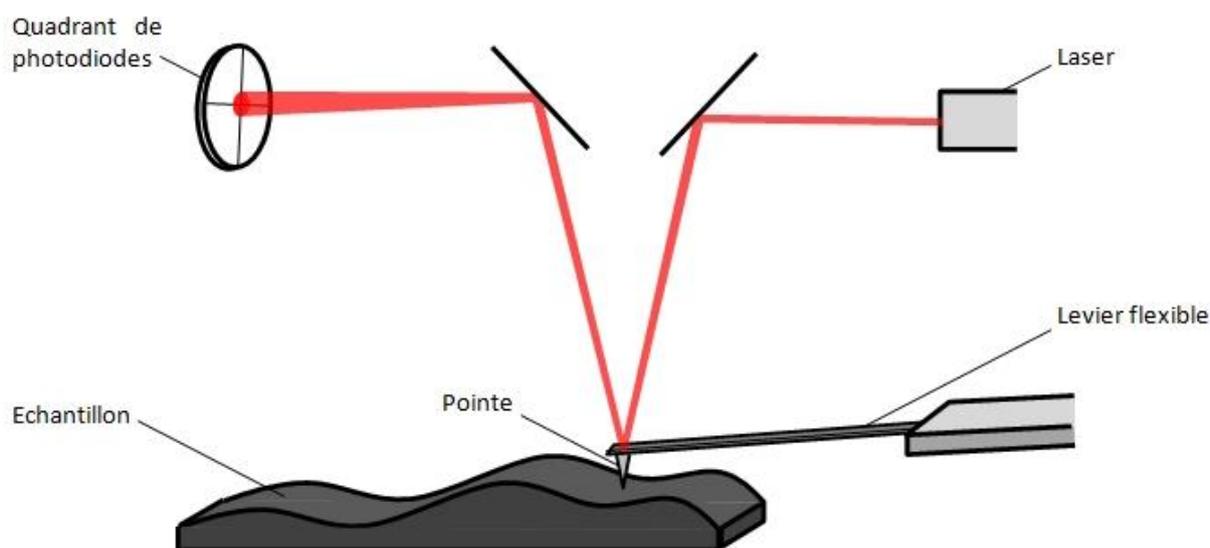


Figure 2. Principe de fonctionnement du microscope à force atomique (image adaptée de CultureSciences Chimie ENS)

La résolution et la qualité de l'analyse dépend de trois éléments essentiels : la qualité de la pointe (dimension et composition), le tube piézoélectrique permettant le déplacement et la vibration de l'échantillon, le détecteur photodiode permettant de suivre les oscillations du laser.

Plusieurs modes de mesure existent : contact, tapping et non contact. Le mode tapping, ou contact intermittent est le mode le plus utilisé et consiste à faire vibrer la pointe à proximité de la surface de l'échantillon et de mesurer les variations de ses vibrations à mesure que l'échantillon est balayé. C'est le mode que nous utilisons dans le cadre de cette thèse. Les mesures AFM effectuées sur les échantillons de PDMS sont réalisées sur un microscope AFM Agilent Pico Plus 5500 LS en mode tapping à l'air ambiant avec une pointe en silicium.

2.5. La microscopie optique à fluorescence

La microscopie optique à fluorescence permet d'observer des structures au sein d'échantillons bidimensionnels (surfaces). On peut alors attribuer une intensité fluorescente à un point donné de l'échantillon et ainsi étudier la répartition de la réponse fluorescente sur toute la

surface en fonction du phénomène recherché. La fluorescence est une propriété que possèdent certains corps d'émettre des photons après avoir absorbé des photons plus énergétiques. Cette perte d'énergie entre la longueur d'onde d'excitation et d'émission de l'espèce fluorescente s'explique par le déplacement de Stokes. La qualité d'un fluorophore est notamment donnée par la taille du déplacement de Stokes : il sera plus facile d'observer la fluorescence si on excite l'échantillon dans un domaine de longueur d'onde bien distinct de celui dans lequel l'échantillon émet sa fluorescence.

On distingue deux types de fluorescence : primaire si l'échantillon fluoresce naturellement (auto-fluorescence) et secondaire si l'échantillon doit être marqué par une molécule fluorescente afin d'être identifié (ex : fluorescéine pour certaines protéines, DAPI pour l'ADN, ect.) Dans le cas de la fluorescence secondaire, plus l'affinité et la spécificité entre l'espèce à marquer et le marqueur est grande, plus l'observation est précise, car seules les espèces d'intérêts fluorescent.

Dans le cas d'un microscope optique à fluorescence, le montage permet généralement l'excitation d'un échantillon à différentes longueurs d'ondes et l'observation de la fluorescence en filtrant des longueurs d'onde données afin de sélectionner les plus pertinentes. Pour cela, un jeu de filtres interchangeables est monté entre l'échantillon, la source lumineuse et l'oculaire (ou la caméra). Un miroir dichroïque permet de sélectionner les longueurs d'ondes passantes et réfléchies.

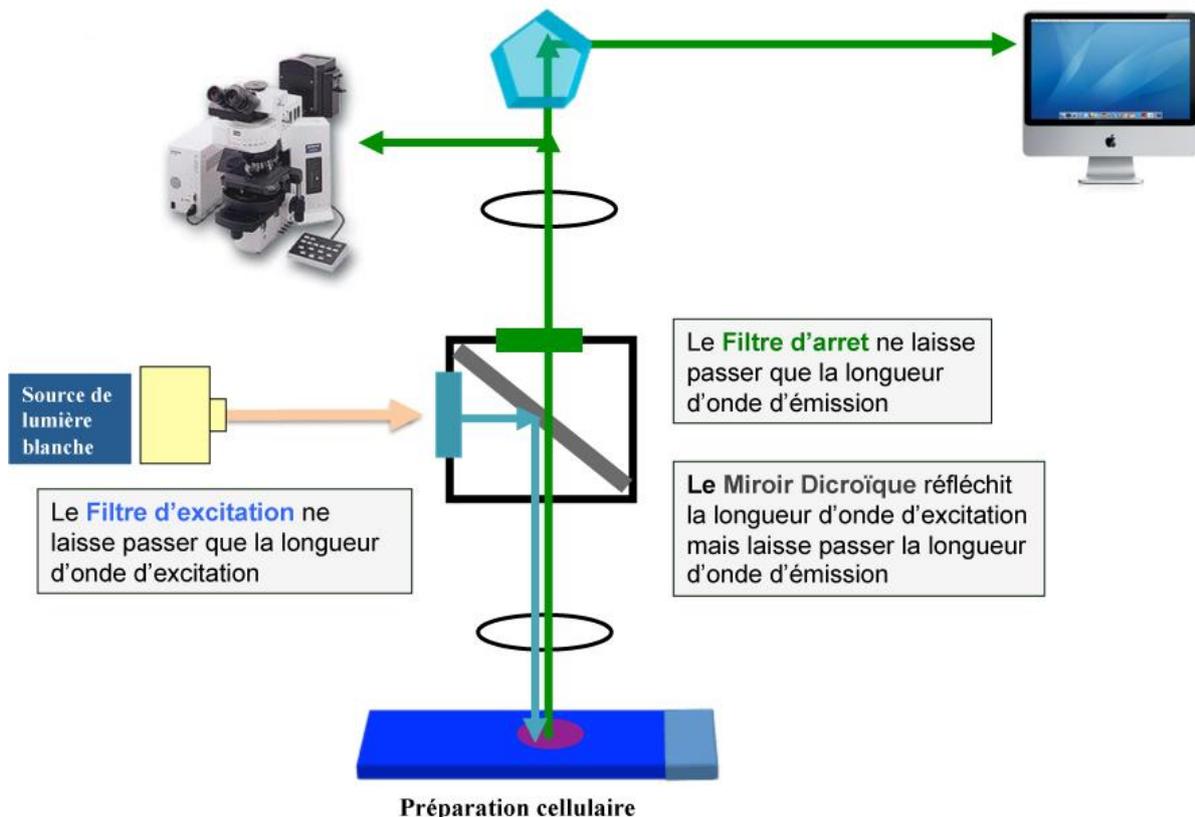


Figure 3. Schéma du principe général de la microscopie optique à fluorescence (adaptée de Cytogénétique moléculaire - Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale - S. Romana, V. Malan)

Bien sûr, cette technique présente plusieurs limites : une résolution limitée par des phénomènes de diffraction (200 nm environ), l'auto-fluorescence du substrat, le vieillissement des espèces fluorescentes à la lumière (photoblanchiment), l'impossibilité d'étudier plusieurs couches à la fois (dans le cas de la microscopie classique). D'autres techniques de microscopie fluorescente parviennent à pallier à ces limites (microscopie confocale, microscopie TIRF,...)

Dans le cadre de cette thèse, les observations de microscopie à fluorescence ont été faites sur un microscope optique inversé à large champ Axio Observer Zeiss avec un grossissement x10 et un temps d'acquisition variable en fonction des observations (1500 ms pour les anticorps FITC et 300 ms pour la fluorescamine). Les diodes lasers sont réglées à 50% de leur puissance pour l'excitation. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées sont de 385 nm pour les expériences avec la fluorescamine et 475 nm pour le FITC. Les images sont acquises par le logiciel Zen Pro et exportées pour être traitées sur le logiciel Icy [3] afin d'optimiser la quantification de la réponse en fluorescence des échantillons étudiés.

Chaque image est acquise en couleur (64 bits) dans Zen Pro et convertie en niveau de gris (8 bits) dans Icy afin de réduire l'analyse à un seul canal. Icy fournit alors un histogramme brut du nombre de pixel par valeur possible d'intensité fluorescente (256 valeurs possibles, de 0 à 255, pour une image 8 bit) (voir Figure 4).

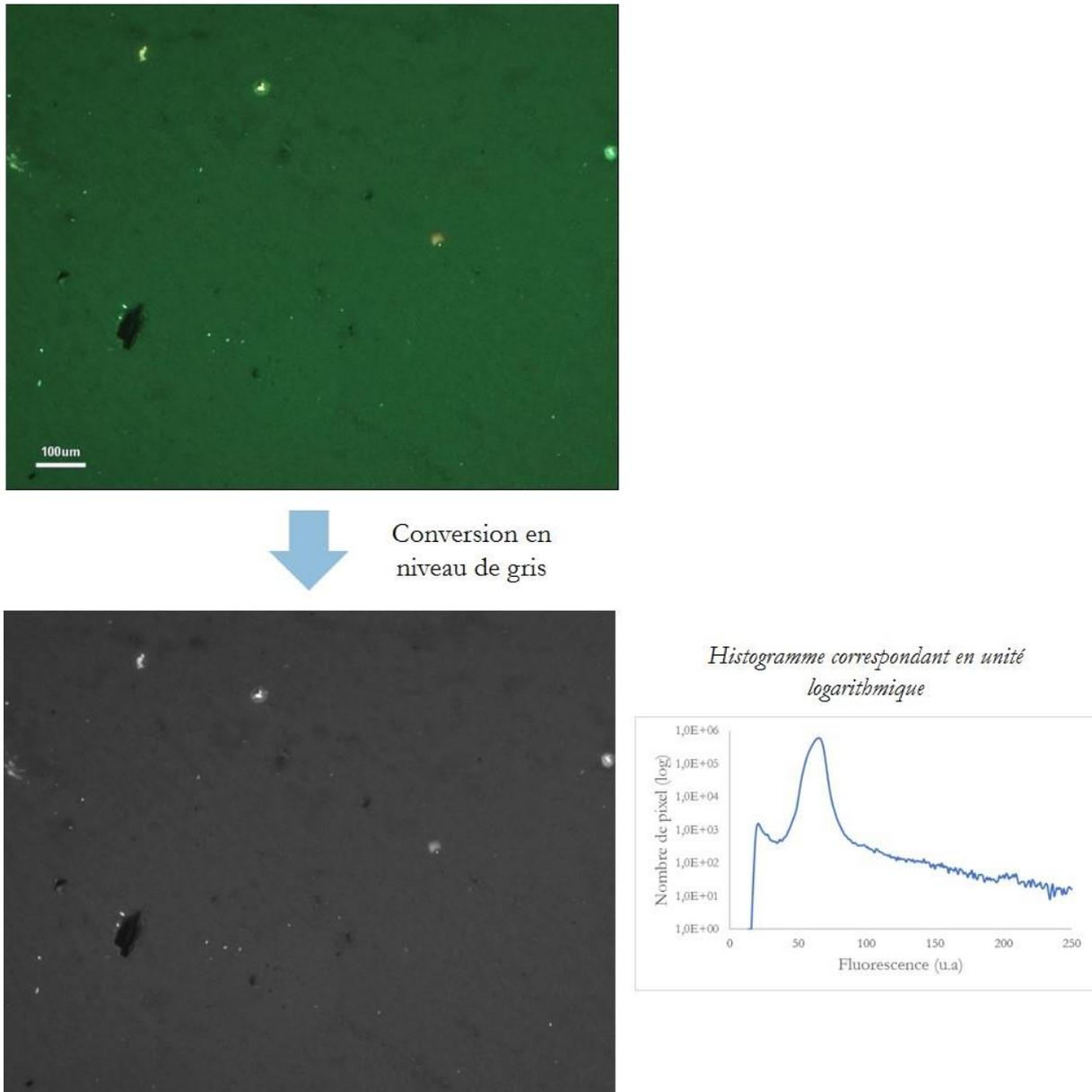


Figure 4. Conversion de l'image brute en niveau de gris et extraction de l'histogramme correspondant

En fonction de la forme de l'histogramme, un seuil est défini manuellement et appliqué par la fonction seuil (*Threshold*) du logiciel permettant d'extraire en région d'intérêt (ROI) la zone définie par les limites du seuil. Les pixels non compris dans cette zone se voient alors assignés une valeur nulle. Parmi eux se trouvent les pixels d'intensité trop élevée (donc les agrégats) et les pixels d'intensité trop faible (le bruit de fond, les défauts de surface et les aberrations de lumière du microscope comme les zones d'ombres).

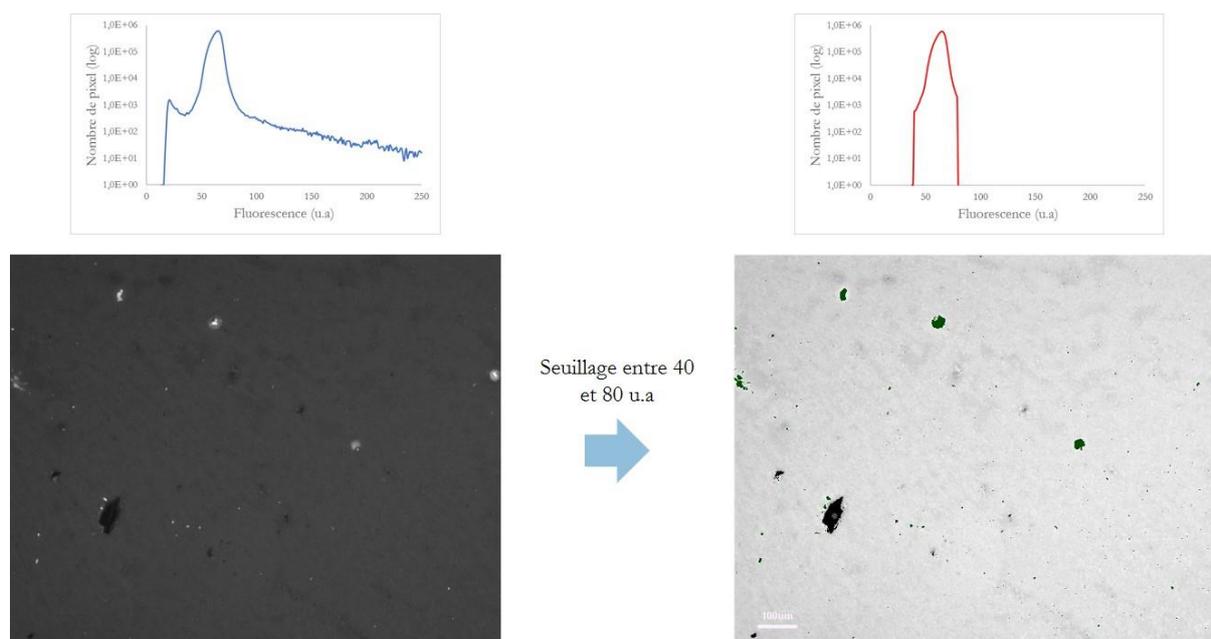


Figure 5. Seuillage de l'image en niveaux de gris et extraction de l'histogramme traitée

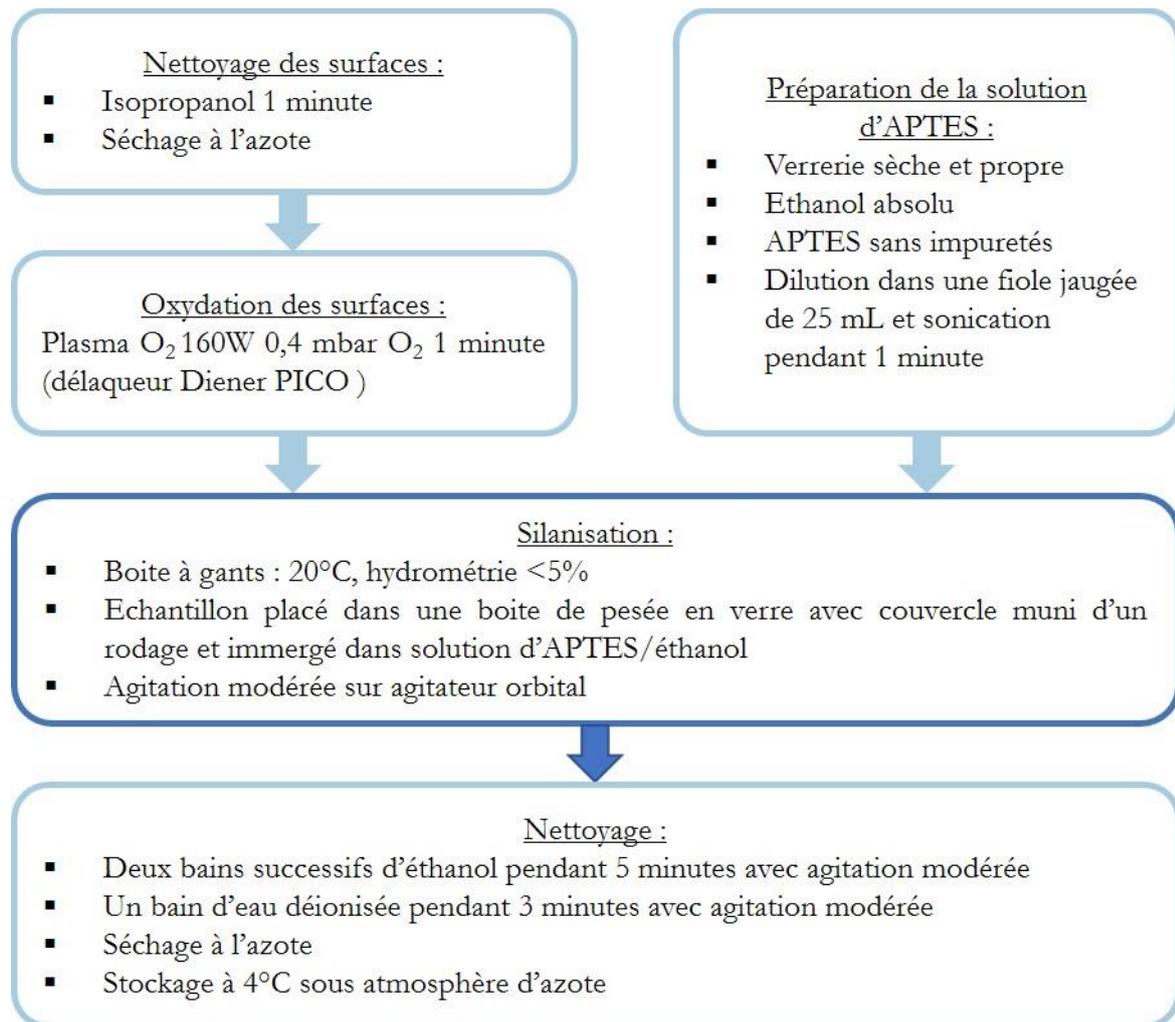
La Figure 5 montre le cas d'une photo d'un échantillon présentant des agrégats ainsi que des défauts de surface du PDMS. Le traitement permet de s'acquitter des défauts principaux de l'image afin de ne conserver que la zone d'intérêt avec la réponse fluorescente à quantifier (zone grise de la dernière image, après soustraction des agrégats et des défauts). Dans le cas des canaux microfluidique, le traitement permet également d'éliminer les zones de l'image hors canal.

De l'image traitée est ensuite extrait un histogramme permettant de calculer l'intensité fluorescente moyenne de l'image. De même, l'erreur quadratique moyenne est calculée pour chaque image, afin d'évaluer la variation de l'intensité de chaque pixel par rapport à la fluorescence moyenne de l'image et donc de mesurer l'homogénéité de la réponse. Plusieurs photos sont prises par échantillons (entre 5 et 10 en fonction de la taille de la surface) et une intensité globale moyenne de la surface est calculée avec une erreur quadratique moyenne sur la répartition de l'intensité sur la surface. Enfin, plusieurs répliques de surface sont étudiés afin d'obtenir une valeur moyenne de réponse fluorescente pour un type d'échantillon dans des conditions de silanisation et/ou greffage données. Les barres d'erreurs présentées sur les figures correspondent à l'écart-type pour les différents répliques.

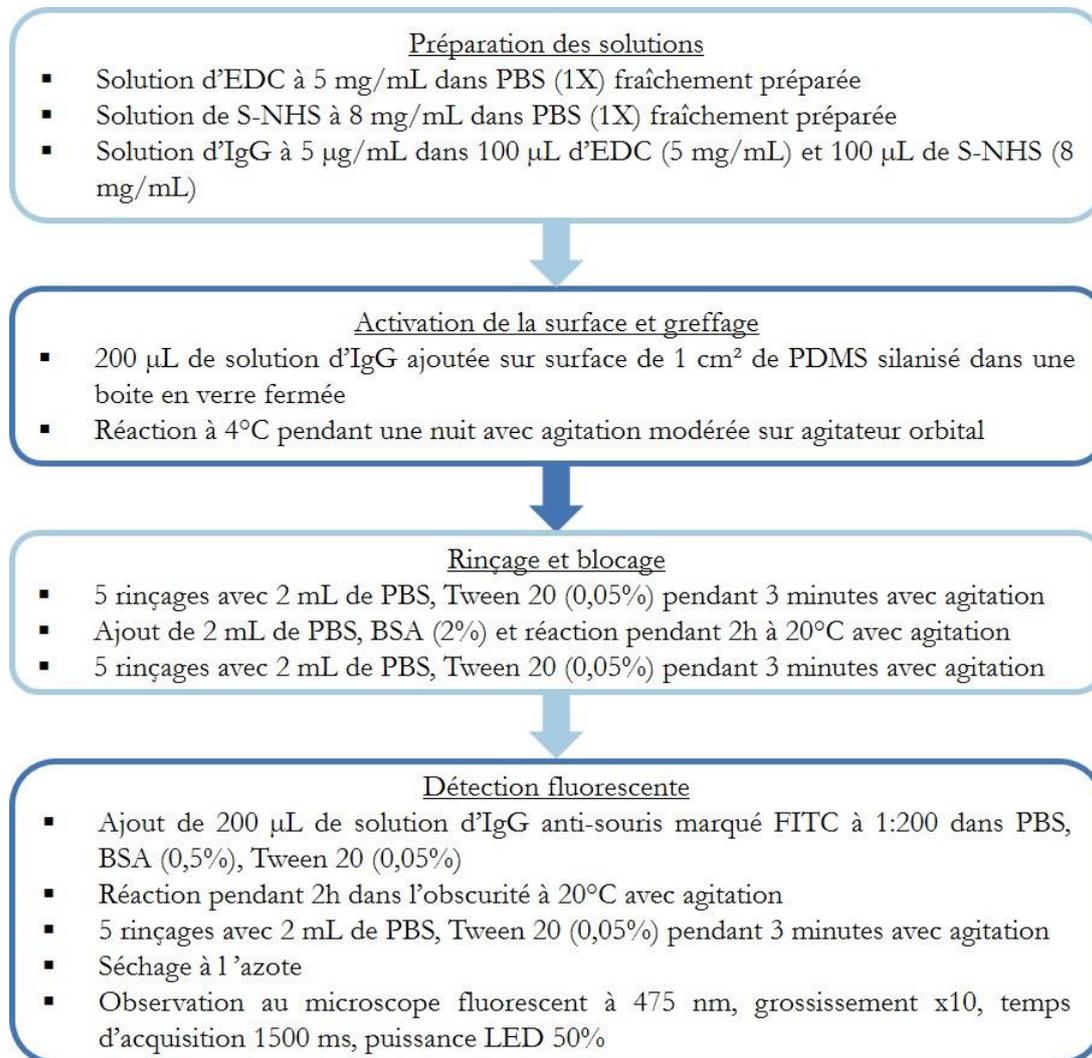
Pour le calcul des limites de détection, une régression linéaire est effectuée dans les zones linéaires de courbes d'immunodosage dans le logiciel GraphPad Prism 8. A partir de cette régression, on obtient l'écart-type (S_y) sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression et le coefficient directeur de la droite de régression (S). La LOD correspond alors à :

$$\text{LOD} = 3.3 (S_y/S)$$

3. Silanisation des couches de PDMS par l'APTES



4. Greffage et détection des IgG de souris sur les couches de PDMS silanisées



5. Immunodosage du TNF- α sur les couches de PDMS silanisées en pleine plaque

Préparation des solutions

- Solution d'EDC à 5 mg/mL dans PBS (1X) fraîchement préparée
- Solution de S-NHS à 8 mg/mL dans PBS (1X) fraîchement préparée
- Solution d'IgG à 5 μ g/mL dans 100 μ L d'EDC (5 mg/mL) et 100 μ L de S-NHS (8 mg/mL)

Activation de la surface et greffage

- 200 μ L de solution d'IgG ajoutée sur surface de 1 cm² de PDMS silanisé dans une boîte en verre fermée
- Réaction à 4°C pendant une nuit avec agitation modérée sur agitateur orbital

Rinçage et blocage

- 5 rinçages avec 2 mL de PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 3 minutes avec agitation
- Ajout de 2 mL de PBS, BSA (2%) et réaction pendant 2h à 20°C avec agitation
- 5 rinçages avec 2 mL de PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 3 minutes avec agitation

Capture de l'antigène

- Ajout de 150 μ L de TNF- α à 1.0 μ g/mL dans le PBS (1X)
- Réaction pendant 2h à 20°C avec agitation
- 5 rinçages avec 2 mL de PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 3 minutes avec agitation

Détection de l'antigène

- Ajout de 150 μ L d'anticorps primaire de chèvre anti-TNF- α à 1.0 μ g/mL
- Réaction pendant 2h à 20°C avec agitation
- 5 rinçages avec 2 mL de PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 3 minutes avec agitation

Détection des anticorps primaires

- Ajout de 150 μ L d'anticorps secondaires FITC anti-chèvre à 10.0 μ g/mL
- Réaction pendant 2h à 20°C dans l'obscurité avec agitation
- 5 rinçages avec 2 mL de PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 3 minutes avec agitation
- Séchage à l'azote
- Observation au microscope fluorescent à 475 nm, grossissement x10, temps d'acquisition 1500 ms, puissance LED 50%

6. Passivation du PDMS par le PEO (protocole Ha Hong Cao)

Préparation des solutions et de la surface

- Solution de PEO à 0.2% préparé en pesant 0.1g de PEO ($M_w \sim 400\ 000$, Sigma Aldrich) dans 50 mL d'eau déionisée (EDI) chauffée à 80°C et agitation pendant 1h
- Solution de HCl à 1M à partir de 4.2 mL de HCl (37%) dans 50 mL de volume finale de solution
- Solution acidifiée de PEO (0.2%), HCl (0.1 M) en ajoutant 1 mL de HCl (1M) dans 9 mL de PEO (0.2%)
- Solutions stockées à 4°C, au maximum 2 semaines sauf la solution de PEO acidifiée à utiliser sous 24h
- Surface lavée à l'éthanol et séchée à l'azote



Activation de la surface et réaction

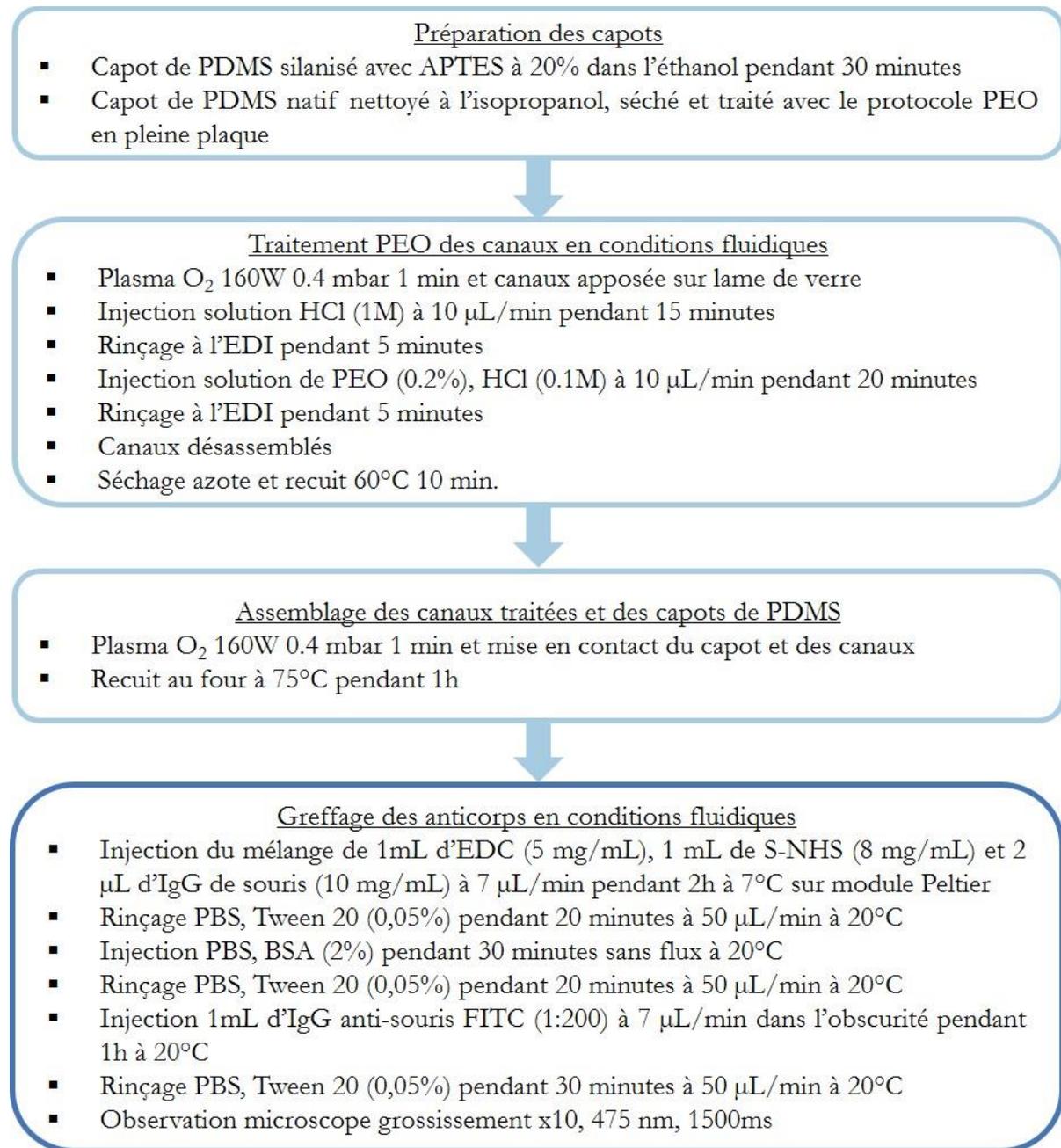
- Surface oxydée par plasma O_2 : 160W 0.4mbar 1 min (délaqueur Pico, Diener)
- Surface immergée dans solution de HCl (1M) pendant 15 minutes avec agitation puis rincée à l'EDI pendant 2 minutes
- Surface immergée dans solution de PEO à 0.2% acidifiée avec 0.1M de HCl pendant 20 minutes avec agitation



Rinçage et séchage

- Surface rincée dans EDI pendant 2 minutes puis sécher à l'azote
- Recuit au four à 50°C pendant 10 minutes pour terminer le séchage

7. Protocole de passivation des puces et greffage des anticorps sous flux



8. Protocole optimisé de passivation des surfaces de PDMS

Préparation des solutions et de la surface

- Solution de PEO à 0.2% préparé en pesant 0.1g de PEO ($M_w \sim 400\ 000$, Sigma Aldrich) dans 50 mL d'eau déionisée (EDI) chauffée à 80°C et agitation pendant 1h
- Solution de HCl à 1M à partir de 4.2 mL de HCl (37%) dans 50 mL de volume finale de solution
- Solution acidifiée de PEO (0.2%), HCl (0.1 M) en ajoutant 0.5 mL de HCl (1M) dans 4.5 mL de PEO (0.2%)
- Solutions stockées à 4°C, au maximum 2 semaines sauf la solution de PEO acidifiée à utiliser sous 24h
- Surface de PDMS natif lavée à l'éthanol et séchée à l'azote



Activation de la surface et réaction

- Surface oxydée par plasma O_2 : 160W 0.4mbar 1 min (délaqueur Pico, Diener)
- Surface immergée dans solution de HCl (1M) pendant 30 minutes avec agitation
- Surface immergée dans solution de PEO à 0.2% acidifiée avec 0.1M de HCl pendant 40 minutes avec agitation



Rinçage et séchage

- Surface rincée dans EDI pendant 2 minutes puis sécher à l'azote
- Recuit au four à 60°C pendant 10 minutes pour terminer le séchage

9. Protocole optimisé de passivation des puces et greffage d'anticorps sous flux

Préparation des surfaces

- Capot de PDMS natif nettoyé à l'isopropanol, séché et traité avec le protocole PEO optimisé en pleine plaque
- Canaux de PDMS moulés traités avec le protocole PEO optimisé en conditions fluidiques

Assemblage des canaux traités et des capots de PDMS

- Plasma O₂ 160W 0.4 mbar 1 min et mise en contact du capot et des canaux
- Recuit au four à 75°C pendant 1h

Greffage des anticorps en conditions fluidiques

- Canal rincé avec PBS (1X) pendant 10 minutes à 20 µL/min
- Injection du mélange de 500 µL d'EDC (2 mg/mL) et 500 µL de S-NHS (5 mg/mL) pendant 20 minutes à 3 µL/min à 15°C
- Rinçage PBS pendant 15 minutes à 20 µL/min à 20°C
- Injection des IgG de souris à 10 µg/mL pendant 2h à 3 µL/min à 8°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 20 minutes à 20 µL/min à 20°C
- Injection PBS, BSA (2%) pendant 20 minutes à 3 µL/min à 20°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 30 minutes à 20 µL/min à 20°C
- Injection d'IgG anti-souris FITC à 1:200 et 1:400 respectivement dans chaque canal à 3 µL/min dans l'obscurité pendant 1h à 20°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 30 minutes à 30 µL/min à 20°C
- Observation microscope grossissement x10, 475 nm, 1500ms

10. Protocole de greffage d'IgG en conditions fluidiques et détection par fluorescence

Activation de la surface

- Canal rincé avec PBS (1X) pendant 10 minutes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Injection du mélange de 500 μL d'EDC (2 mg/mL) et 500 μL de S-NHS (5 mg/mL) pendant 20 minutes à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 15°C
- Rinçage PBS pendant 15 minutes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20°



Greffage des anticorps de capture

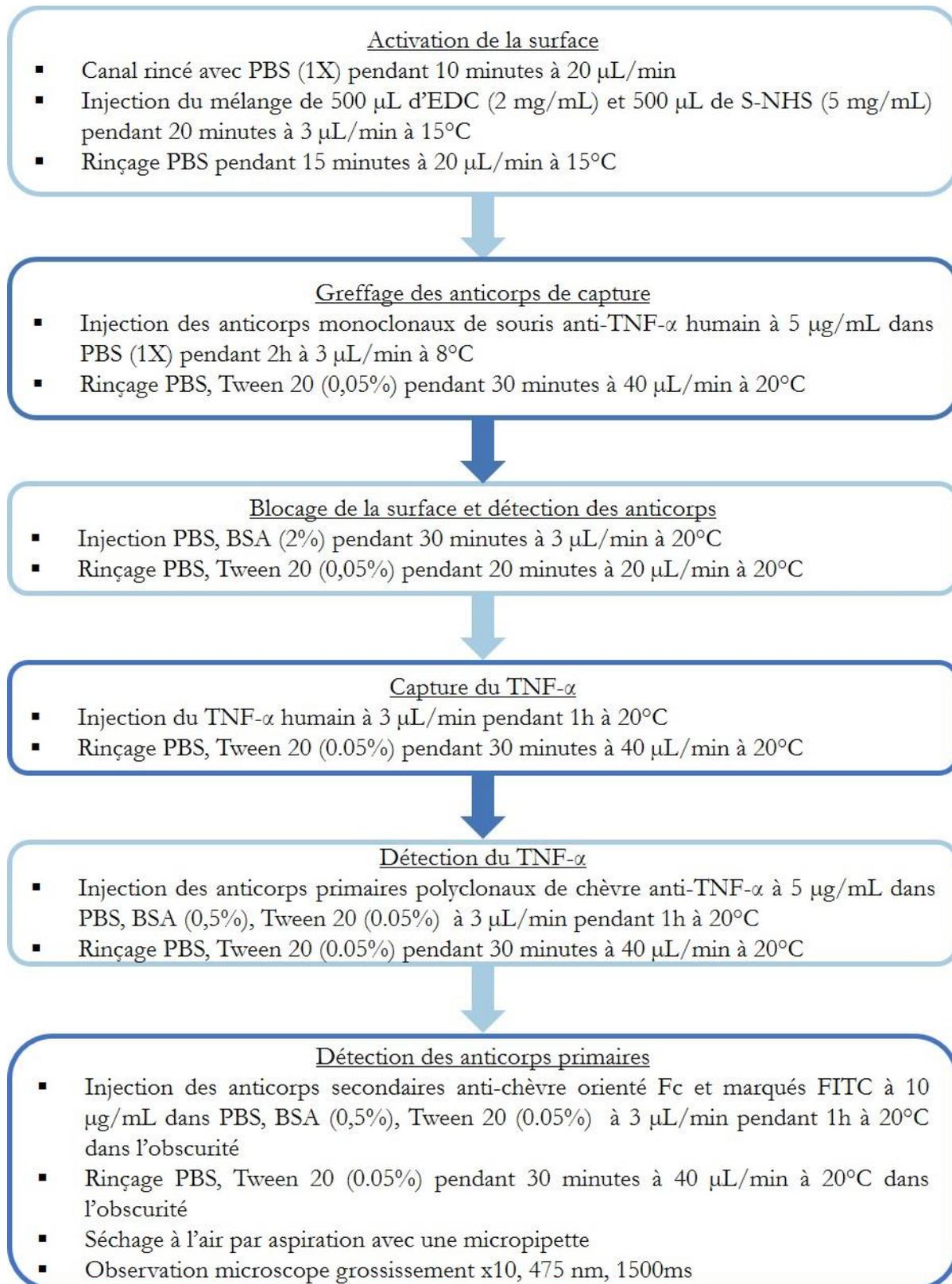
- Injection des IgG de souris à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 2h à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 8°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 20 minutes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20°C



Blocage de la surface et détection des anticorps

- Injection PBS, BSA (2%) pendant 30 minutes à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0,05%) pendant 30 minutes à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20°C
- Injection d'IgG anti-souris FITC à 1:400 dans PBS, BSA (0,5%), Tween 20 (0.05%) à 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans l'obscurité pendant 1h à 20°C
- Rinçage PBS, Tween 20 (0.05%) pendant 30 minutes à 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20°C dans l'obscurité
- Séchage à l'air par aspiration avec une micropipette
- Observation microscope grossissement x10, 475 nm, 1500ms

11. Protocole d'immunodosage du TNF- α en conditions fluidiques



Annexes Chapitre 3

1. Protocoles de greffage des billes magnétiques

1.1. Protocole de greffage des billes Dynabeads COOH

100 μL de Dynabeads MyOne Carboxylated (10 mg/mL) sont ajoutés dans 4 tubes Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL et lavées avec 1 mL de NaOH (20mM) pendant la nuit à 4°C sur un agitateur rotatif (Tube rotator SB3, Stuart, UK) à 20 rpm. Les billes sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et rincées 3 fois avec 500 μL de PBS (1X). Puis, 120 μL d'IgG humaine à 0.66 mg/mL dans le PBS sont ajoutés aux billes. Deux solutions de 200 mg d'EDC et 200 mg de S-NHS sont préparées dans 200 μL de PBS chacune et ajoutées aux billes. Enfin, le volume de chaque tube est ajusté à 800 μL avec 280 μL de PBS, aboutissant à une concentration finale d'IgG de 0.1 mg/mL pour 1 mg de billes. Les tubes sont ensuite placés sur un agitateur rotatif à 20 rpm pendant la nuit à 4°C pour le greffage des anticorps. Les billes sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et le surnageant est prélevé et conservé à 4°C jusqu'à analyse. Les billes sont rincées 2 fois avec 500 μL de PBS, Tween 20 (0.05%) et une fois avec 500 μL de PBS. Les solutions issues du rinçage sont conservées à 4°C jusqu'à analyse.

1.2. Protocole de greffage des billes Dynabeads Ts

10 μL de Dynabeads MyOne Tosylactivated (100 mg/mL) sont ajoutées à 4 tubes Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL et rincées avec 500 μL de tampon de borate de sodium à 0.1M pH 9.5, passées au vortex quelques secondes et agitées délicatement sur un Thermomixer Eppendorf pendant 15 min à 25°C et 650 rpm. 60 μL d'IgG humaine à 0.66 mg/mL dans le PBS sont ajoutés aux billes avec 60 μL de tampon de borate d'ammonium à 3.0M pH 9.5 et 20 μL de tampon de borate de sodium 0.1M pH 9.5. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C et agités à 650 rpm sur le Thermomixer pendant 16h puis passés dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes pour éviter l'adhésion des billes sur les parois des tubes. Les billes sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et le surnageant est prélevé et conservé à 4°C jusqu'à analyse. Les billes sont rincées 2 fois avec 500 μL de PBS, Tween 20 (0.05%) et une fois avec 500 μL de PBS. Les solutions issues du rinçage sont conservées à 4°C jusqu'à analyse.

1.3. Protocole de greffage des billes Dynabeads Streptavidin

Ces billes nécessitent la biotinylation préalable des anticorps. Pour cela, le kit EZ-link sulfo-NHS-LC-biotin est utilisé. 10 mM de solution de biotin est préparée en ajoutant 224 μL d'eau ultra-pure à 1mg de biotin. 6.66 μL de solution de biotin sont ajoutés à 1.0 mL de solution d'IgG humaine à 0.5 mg/mL et le tout est incubé à 25°C pendant 30 minutes et agité à 300 rpm sur le Thermomixer. La solution est ensuite ultrafiltrée sur une cartouche filtre de 50 kDa à 4°C, 10 000 rpm pendant 4 minutes sur une centrifugeuse MicroStar 17R (VWR) pour éliminer les résidus de sels de biotin. 100 μL de billes Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (10 mg/mL) sont ajoutées à 4 tubes Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL et rincées avec 1 mL de PBS, Tween 20 (0.05%). Les billes sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et rincées 3 fois avec 500 μL de PBS, Tween 20 (0.05%). 40 μL de hIgG biotinylées à 0.5 mg/mL sont ajoutés aux billes avec 160 μL de PBS. Les tubes sont ensuite incubés à 25°C, 450 rpm pendant 30 minutes sur le Thermomixer. Les billes sont alors

immobilisées sur un support magnétique et le surnageant est prélevé et conservé à 4°C. Les billes sont ensuite rincées 4 fois avec 500 µL de PBS, Tween 20 (0.05%). Les solutions issues du rinçage sont conservées à 4°C jusqu'à analyse.

1.4. Protocole de greffage des billes Pierce Protein G

100 µL de billes Pierce Protein G (10 mg/mL) sont ajoutés dans 4 tubes Eppendorf Protein LoBind de 1.5mL et rincées avec 500 µL de Tris, Tween 20 (0.05%) et délicatement agitées sur un vortex. Le processus est répété une seconde fois avec 1 mL de Tris, Tween 20 (0.05%). 217 µL de hIgG à 0.23 mg/mL sont ajoutés aux billes avec 283 µL de Tris, Tween 20 (0.05%). Les tubes sont ensuite incubés à 25°C, 650 rpm pendant 1h sur le Thermomixer. Les billes sont ensuite immobilisées sur un support magnétique et les surnageants sont collectés et conservés à 4°C pour analyse. Les billes sont ensuite rincées 2 fois avec 500 µL de Tris, Tween 20 (0.05%). Les solutions issues du rinçage sont conservées à 4°C jusqu'à analyse.

2. Principe de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Très brièvement, la chromatographie par exclusion stérique se compose d'une colonne poreuse rempli de particules de taille donnée. Quand un échantillon liquide passe au travers de cette colonne, les molécules qui le composent vont adopter des trajets différents entre les pores en fonction de leur volume hydrodynamique (directement relié à la taille de la molécule). Plus une molécule a un volume hydrodynamique important, moins elle sera retenue dans la colonne et plus son temps de rétention sera faible. Inversement, une molécule de faible volume hydrodynamique subira des déviations très fréquentes de son trajet au sein de la colonne par la rencontre avec une particule de taille similaire ou plus grande, ce qui retardera sa sortie de la colonne. On peut ainsi séparer de nombreuses molécules, et en particulier des protéines. Enfin, comme pour toute technique chromatographique, la nature de la colonne et de la phase mobile sont des paramètres essentiels pour la bonne séparation des molécules d'intérêts.

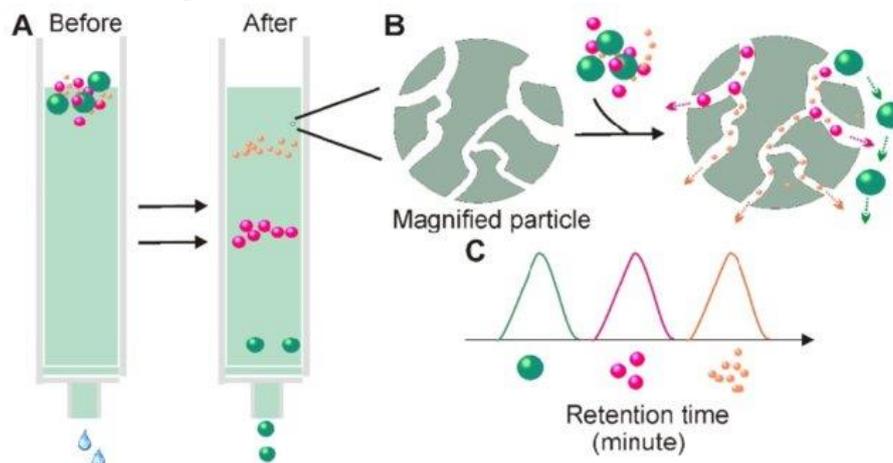


Figure 6. Principe de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique : les analytes sont séparés en fonction de leur rayon hydrodynamique au sein des pores de la colonne (adapté de [4])

3. Procédure d'immunodosage sur billes T's en tube

La procédure est réalisée en triplicat pour chaque concentration de TNF- α :

- 1) Prélever 20 μ L de billes Dynabeads MyOne Tosylactivated (100 mg/mL) et les placer dans tube Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL
- 2) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 3) Retirer le surnageant
- 4) Ajouter 1 mL de tampon borate (0.1 M pH 9.5)
- 5) Mélanger sur vortex pendant 30 secondes puis 15 min sur Thermomixer à 20°C 800 rpm
- 6) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 7) Retirer le surnageant
- 8) Ajouter 30 μ L de solution d'anticorps de capture diluée 5 fois (0.32 mg/mL)
- 9) Ajouter 30 μ L de tampon ammonium 3.0M pH 9.5 + 10 μ L de tampon borate 0.1M pH9.5
- 10) Incuber à 37°C pendant 16h à 650 rpm sur Thermomixer
- 11) Placer le tube dans une bain à ultrason pendant 10 minutes puis vortexer 30s
- 12) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 13) Retirer le surnageant
- 14) Ajouter 1 mL de solution de PBS, BSA (0.5%), Tween 20 (0.05%) et incuber pendant 1h à 37°C 700 rpm sur Thermomixer
- 15) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 16) Retirer le surnageant
- 17) Ajouter 1 mL de PBS, BSA (0.1%), Tween 20 (0.05%), mélanger, placer sur le support magnétique et retirer le surnageant. Renouveler l'opération deux fois et laisser agiter 15 minutes sur Thermomixer à 700 rpm à 20°C pour le dernier rinçage.
- 18) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 19) Retirer le surnageant
- 20) Ajouter 100 μ L de solution de TNF- α
- 21) Incuber 3h à 20°C à 600 rpm sur Thermomixer
- 22) Rincer 5X avec 500 μ L de PBS, Tween 20 (0.05%) et laisser 5 minutes sur Thermomixer 700 rpm pour le dernier rinçage
- 23) Ajouter 100 μ L de solution d'anticorps de détection diluée 250 fois
- 24) Incuber 2h à 20°C, 650 rpm sur Thermomixer
- 25) Rincer 5X avec 500 μ L de PBS, Tween 20 (0.05%) et laisser 5 minutes sur Thermomixer 700 rpm pour le dernier rinçage
- 26) Ajouter 100 μ L de solution d'Avidin-HRP diluée 250 fois
- 27) Incuber 30 minutes à 20°C, 650 rpm sur Thermomixer
- 28) Rincer 6X avec 500 μ L de PBS, Tween 20 (0.05%) et laisser 5 minutes sur Thermomixer 700 rpm pour le dernier rinçage
- 29) Ajouter 100 μ L de solution de TMB (1X)
- 30) Incuber 15 minutes à 20°C, 650 rpm
- 31) Ajouter 50 μ L de solution Stop
- 32) Placer le tube sur un support magnétique et attendre 1 minute
- 33) Prélever le surnageant et le placer dans un puit d'une microplaque pour lecture sur spectrophotomètre
- 34) Lire l'absorbance à 450 nm et soustraire l'absorbance à 570 nm

Annexes Chapitre 4

1. Procédé de fabrication des microbobines de capture

1.1. Nettoyage et oxydation des substrats de silicium

Les substrats de silicium de 4 pouces sont nettoyés dans une solution de Piranha et de BHF. Puis une couche de silice de 100 nm est déposée sur les deux faces du substrat par oxydation thermique humide à 1050°C (four VEGATEC).

1.2. Lift-off des sous-pistes de cuivre

Le substrat est déshydraté pendant 15 minutes sur une plaque chauffante à 150°C. Une couche de 1.4 µm de LOR 30B (Microchem) est enduite sur le substrat à 6000 rpm pendant 45 secondes à une accélération de 4000 rpm/s. Le substrat est ensuite recuit pendant 6 minutes à 150°C.

Une couche de 2.7 µm de résine S1818 (Microchem) est enduite à 2000 rpm pendant 30 secondes à une accélération de 1000 rpm/s. Le substrat est recuit à 110°C pendant 90 secondes.

Les motifs des sous-pistes de bobines sont obtenus par photolithographie UV sur un aligneur Suss MJB4 en mode Hard Contact pendant 18 secondes avec une insolation en large spectre (sans filtre). Les motifs sont ensuite développés dans une solution de MF-319 (Microchem) pendant 70 secondes. Le bon développement des motifs est vérifié au microscope optique.

L'épaisseur des deux couches de résine est caractérisée au profilomètre mécanique (Veeco Dektak) à 4.1 µm. Pour s'assurer qu'un résidu de résine ne reste dans les motifs, le substrat est traité avec un plasma d'oxygène dans un bâti de RIE (Reactive Ion Etching) (Nextral NE100), à 10 W 40 mTorr 20 sccm O₂ pendant 2 minutes avec un suivi de fin d'attaque laser.

La métallisation du substrat est effectuée dans un bâti d'évaporation sous-vide (PLASSYS MEB400). 10 nm de titane sont déposés à une pression minimum de $1,5 \cdot 10^{-7}$ mbar et une vitesse de 1 nm/sec. 800 nm de cuivre sont déposés à une pression minimum de $8,0 \cdot 10^{-8}$ mbar à une vitesse de 2 nm/s.

Le lift-off est réalisé dans du remover EBR PG chauffé à 70°C, assisté d'un bain à ultrasons.

1.3. Dépôt de la couche de diélectrique pour l'isolation des sous-pistes de cuivre et gravure

500 nm de silice sont déposés par PE-CVD (ApSy Multiplex 100). Les conditions de dépôt sont 170 sccm de N₂, 399 sccm d'un mélange de SiH₄ 2%/N₂, 1420 sccm de N₂O, une pression de 550 mT, à basse fréquence (380 kHz/60W) à 280°C pendant 7 minutes et 30 secondes.

Le substrat est ensuite déshydraté à 125°C pendant 5 minutes sur plaque chauffante avant de déposer une couche de 3.5 µm de résine S1818 (Microchem) à 1200 rpm pendant 30 secondes à 1000 rpm/s. Le substrat est ensuite recuit pendant 90 secondes à 110°C.

Les motifs de gravure de la silice au niveau des extrémités des sous-pistes sont obtenus par photolithographie UV sur un aligneur Suss MJB4 en mode Hard Contact pendant 23 secondes avec une insolation en large spectre (sans filtre). Les motifs sont ensuite développés dans une solution de MF-319 (Microchem) pendant 1 minute. Le bon développement des motifs est vérifié au microscope optique.

Pour s'assurer qu'un résidu de résine ne reste dans les motifs, le substrat est traité avec un plasma d'oxygène dans un bâti de RIE (Nextral NE100), à 10 W 40 mTorr 20 sccm O₂ pendant 2 minutes avec un suivi de fin d'attaque laser.

La gravure de 500 nm de silice est réalisée dans un bâti de RIE (Advanced Vacuum) avec suivi de fin d'attaque laser. Les conditions de gravure sont 40 sccm de SF₆ et CF₄ à 40 mTorr et 200W de puissance RF. La gravure est en générale terminée au bout de 12 minutes.

Alternativement, cette étape peut être réalisée dans un bâti Nextral NE100 à 4 sccm de SF₆, 20 sccm de CHF₃, 10W de puissance RF et 20 mTorr pendant 15 minutes.

La résine est ensuite éliminée dans un bain d'acétone. Pour s'assurer qu'un résidu de résine ne reste dans les motifs, le substrat est traité avec un plasma d'oxygène dans un bâti de RIE (Nextral NE100), à 10 W 40 mTorr 20 sccm O₂ pendant 2 minutes avec un suivi de fin d'attaque laser. Le bon déroulement de la gravure est vérifié par microscopie optique, profilomètre mécanique et spectroscopie EDX.

1.4. Micromoulage des microbobines de cuivre

La réalisation de la couche d'accroche pour le dépôt électrolytique est effectuée par métallisation du substrat dans un bâti d'évaporation sous-vide (PLASSYS MEB400). 10 nm de titane sont déposés à une pression minimum de $1,5 \cdot 10^{-7}$ mbar et une vitesse de 1 nm/sec. 100 nm de cuivre sont déposés à une pression minimum de $8,0 \cdot 10^{-8}$ mbar à une vitesse de 2 nm/s.

Puis le substrat est déshydraté à 150°C pendant 15 minutes sur plaque chauffante. 15 µm de résine AZ10XT (Microchem) sont déposés sur le substrat à une vitesse de 1200 rpm pendant 30 secondes à 1000 rpm/s. Le substrat est recuit pendant 3 minutes à 110°C. Le substrat est ensuite laissé au repos à température ambiante pendant 30 minutes minimum pour réhydratation de la résine. Plus le temps de repos est long (4h maximum) plus la qualité de la lithographie est assurée.

Les motifs des bobines sont obtenus par photolithographie UV sur un aligneur Suss MJB4 en mode Vacuum Contact pendant 3 cycles de 200 secondes et 10 secondes repos entre chaque cycle avec une insolation à 320 nm. Les motifs sont ensuite développés dans une solution de AZ400K(Microchem) : eau désionisée en proportion 1:3 pendant 4 minutes et 40 secondes. Le bon développement des motifs est vérifié au microscope optique.

Juste avant le dépôt électrolytique, le substrat est traité avec un plasma d'oxygène dans un bâti de RIE (Nextral NE100), à 10 W 40 mTorr 20 sccm O₂ pendant 2 minutes avec un suivi de fin d'attaque laser.

La croissance des bobines de cuivre est réalisée dans un bain d'électrolyte de cuivre dont la préparation est détaillée dans la partie 2 de cette Annexe. Un additif de type brillanteur (Electrodeposit 270, Shipley) est ajouté au bain avant le dépôt à 2.5 mL/L de bain. La contre-électrode de cuivre est décapée avec une solution d'acide (H₂SO₄ par exemple) avant le dépôt pour retirer l'oxyde formée sur le cuivre. Le bain est agité avec un barreau aimanté à 200 rpm. Le substrat et la contre-électrode de cuivre sont séparés d'une distance de 12 cm.

Le dépôt est effectué dans 1L de solution à l'aide d'un potentiostat Metrohm Autolab PGSTAT204. Les données sont collectées par le logiciel NOVA 2.1 en mode galvanostatique. La densité de courant utilisée est de -30 mA/cm^2 . La surface des motifs représentant 2.1 cm^2 , le courant est fixé à -0.064 A . Une mesure du potentiel d'abandon est réalisée pendant 2 minutes avant l'application du courant. Ce potentiel se situe autour de -7 mV pour ce type de substrat. Le temps de dépôt est fixé à 1100s pour obtenir un dépôt de 10 µm en moyenne.

La résine est ensuite éliminée dans un bain d'acétone. La qualité du dépôt et l'épaisseur sont suivies par microscopie optique et profilomètre mécanique.

1.5. Élimination de la couche d'accroche de Ti/Cu

La couche d'accroche nécessaire au dépôt électrolytique est gravée par Ion Beam Etching (IBE Roth&Rau) avec suivi de gravure par spectrométrie de masse SIMS sur les éléments Ti et Cu. Les paramètres de gravure sont les suivants : puissance 350 W, tension du faisceau 350 V, tension d'accélération 500 V (courant 8 mA), courant neutralisation 200 mA, température du cryostat 0°C, rotation du porte échantillon à 6 rpm, incidence du faisceau par rapport à la normale de l'échantillon (tilt) 20°, refroidissement à l'hélium à 20mbar, débit d'argon 13 sccm, hélium 6 sccm.

1.6. Microsoudure à l'or

Pour la soudure des bobines aux pistes de cuivre du PCB, la microsoudure est effectuée sur une microsouduse JFP Microtechnic avec un fil d'or de 20 µm de diamètre. Les paramètres sont à ajuster en fonction des résultats mais les conditions générales sont :

	Point 1 sur bobine	Point 2 sur PCB
<i>Puissance</i>	750 mW	850 mW
<i>Temps</i>	650 ms	700 ms
<i>Force</i>	0.6 N	0.8 N
<i>Hauteur de descente</i>	0.2	0.2

1.7. Micromoulage des bases de Permalloy (Fe₂₀Ni₈₀)

Pour les bobines comprenant une base de Permalloy, le substrat de silicium nettoyé et oxydé est d'abord métallisé avec 10 nm de Ti et 100 nm de Cu (voir 1.4).

Le substrat est ensuite déshydraté à 125°C pendant 5 minutes avant enduction d'une couche de 27µm d'AZ40XT (Microchem). Le programme de vitesse est le suivant :

- i) Pré-étalement: 500 rpm 10s 200 rpm/s
- ii) Étalement: 3000 rpm 30s 500 rpm/s

La résine est recuite à 65°C pendant 1min30 sur plaque chauffante, puis la plaque est montée à 95°C pendant 2 minutes puis 125°C pendant 3 min30 pour une durée de recuit total de 7 minutes.

Les motifs des bases de Permalloy sont obtenus par photolithographie UV sur un aligneur Suss MJB4 en mode Hard Contact pendant 40 secondes avec une insolation en large spectre (sans filtre). Le substrat est ensuite recuit pendant 20s à 65°C puis 2 min40 à 95°C pour révéler les motifs. Ils sont ensuite développés dans deux bains de MIF-326 (Microchem) pendant 2 minutes et 1 min 30 respectivement. Le bon développement des motifs est vérifié au microscope optique.

Le dépôt électrolytique de Permalloy est réalisé sur un montage similaire au dépôt électrolytique de cuivre mais sans agitation. Le substrat et la contre-électrode sont séparés d'une distance de 2 cm.

Le dépôt est effectué dans 1L de solution à l'aide d'un potentiostat Metrohm Autolab PGSTAT302N (capable d'alimenter avec des courants plus importants que le PGSTAT204 utilisé pour le cuivre). Les données sont collectées par le logiciel NOVA 2.1.

Le mode de dépôt est effectué en courant pulsé avec deux densités de courant appliquées :

$$J_{on} = -10\text{mA/cm}^2 \text{ pendant } 20 \text{ ms}$$

$$J_{\text{off}} = +22.5 \text{ mA/cm}^2 \text{ pendant } 2.22 \text{ ms}$$

Soit pour une surface de masque de 26.73 cm^2 , des courants $I_{\text{on}} = -0.27 \text{ A}$ et $I_{\text{off}} = 0.60 \text{ A}$

Le bain électrolytique est préparé pour un volume de 2L à partir de :

- 0.75 M de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.02 M de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.03 M de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.4 M de d'acide borique H_3BO_3
- 0.016 M de saccharine

Les $20 \mu\text{m}$ de Permalloy sont déposés en 230 minutes réparties ainsi :

- 4 dépôts de 1 minute avec rotation du wafer de 90° entre chaque dépôt et 10 minutes de repos entre chaque dépôt
- 1 jour de repos pour laisser le temps aux premières couches de se relaxer
- 4 dépôts de 10 minutes avec rotation du wafer de 90° entre chaque dépôt et 30 minutes de repos entre chaque dépôt
- Des cycles de 30 minutes de dépôt avec rotation du wafer de 90° entre chaque dépôt et 30 minutes de repos entre chaque dépôt jusqu'à l'épaisseur souhaitée

Des dépôts supérieurs à 30 minutes représentent un risque pour l'échantillon avec le décrochage des couches de Permalloy du fait de contraintes mécaniques trop importantes [5].

Le substrat étant maintenu par une pince crocodile pour l'alimentation en courant, la zone de contact doit être dégagée de toute résine avec un peu d'acétone et un coton-tige. Cette zone doit ensuite est recouverte avant chaque rotation du substrat entre les dépôts avec un peu de résine S1805 (Microchem) et un coton-tige pour éviter le dépôt de Permalloy dans cette zone.

Après dépôt des $20 \mu\text{m}$, la résine est éliminée dans un bain d'acétone. La qualité et l'épaisseur du dépôt sont suivies par microscopie optique, profilomètre mécanique et spectroscopie EDX pour vérifier la bonne stœchiométrie de l'alliage.

Le substrat de Permalloy est ensuite isolé par dépôt de $1 \mu\text{m}$ de silice par PE-CVD à 150°C (ApSy Multiplex 100).

Bibliographie

- [1] J. Rothka, R. Studd, K. Tate, D. Timpe, *Outgassing of Silicone Elastomers*, 2002.
- [2] N. Suzuki, H. Ishida, *A Review on the Structure and Characterization Techniques of Silane/Matrix Interphases*, 1096.
- [3] F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provoost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, J.C. Olivo-Marin, *Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research*, *Nat. Methods*. 9 (2012) 690–696. doi:10.1038/nmeth.2075.
- [4] D. Yang, W. Zhang, H. Zhang, F. Zhang, L. Chen, L. Ma, L.M. Larcher, S. Chen, N. Liu, Q. Zhao, P.H.L. Tran, C. Chen, R.N. Veedu, T. Wang, *Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics*, *Theranostics*. 10 (2020) 3684–3707. doi:10.7150/thno.41580.
- [5] O. Lefebvre, *Développement d'un microdispositif magnétique pour le contrôle et la détection de complexes immunologiques à base de nanoparticules magnétiques*, Université Paris Saclay, 2018.

