

Glossaire :

MEMS : Micro Systèmes Electromécaniques (Micro Electromechanical Systems)

e- beam : lithographie électronique (electron beam lithography)

HMDS : HexaMethylDiSilazane

MEB : Microscope Electronique à Balayage

spin-coating : enduction par force centrifuge

UV : Ultraviolets

RIE : Gravure Ionique réactive (Reactive Ion Etching)

OTS : Octa Triméthyl Siloxane

PDMS : PolyDiMethylSiloxane

μCP : Micro Contact Printing

μTm : Micro Transfert Molding

NIL: Nano Imprint Lithography

MIMIC : MicroMolding In Capillaries

ADN : Acide DésoxiriboNucléique

PCR : Polymerase chain reaction

ISFET : Transistor à effet de champ sensible aux ions

SERS : Spectroscopie Raman exaltée par une surface (SERS)

PFU : Plaques Forming Units : plus petit groupe de virus pathogène

He-Ne : Hélium Néon

PCR : Polymerase Chain Reaction

ATP : Adénosine TriPhosphate

ADP : Adénosine DiPhosphate

Synthèse in-situ : la fabrication directement sur la surface de la sonde

Synthèse ex-situ : le dépôt sur la surface de la sonde déjà synthétisée

QCM : Micro Balance à Quartz (Quartz Crystal Microbalance)

SPR : Résonance Plasmonique de Surface (Surface Plasmon Resonance)

AFM : Microscope à Force Atomique (Atomic Force Microscopy)

PBS : Phosphate Buffer Saline

BSA : Bovine Serum Albumine

PAMAM : PolyAMidoAMine

PU : Poly Uréthane

AC : Anti Corps

MIP : Polymères à Empreintes Moléculaires (Molecular Imprint Polymer)

NIP : Polymère Non Imprimés (Non Imprint Polymer)

MAA : Acide MéthAcrylique

TRIM : TriMéthylolpropane triMéthacrylate

Introduction.....	1
Chapitre I : Etat de l'art : Biopuce et criblage : de la structuration à la détection	5
I-1 : Structuration : techniques existantes et utilisées :.....	5
I-1-1 : Lithographie avancée	5
I-1-1-a : Préparation du substrat	6
I-1-1-b : Photolithographie	6
I-1-1-c : Lithographie électronique	8
I-1-2 : Lithographie douce ou « soft-Lithography »	10
I-1-2-a : Principe de la Lithographie douce	10
I-1-2-b : Les différentes lithographies douces	12
I-1-3 : Jet d'encre	17
I-1-4 : Robot de dépôt	18
I-2 : Présentation biopuce/biocapteur	19
I-2-1 Les différents types de puces	20
I-2-1-a : Puce à ADN	20
I-2-1-b : Puce à protéine.....	21
I-2-2 : Les différentes voies de synthèse	24
I-2-2-a : In situ	24
I-2-2-a-1 : La photolithographie	24
I-2-2-a-2 : Jet d'encre	27
I-2-2-b : Ex situ	29
I-2-3 : Les différents supports	31
I-2-3-a : Lame de verre	31
I-2-3-b : Micros puits	31
I-3 : Criblage pharmaceutique	33
I-4 : Détection d'interactions	36
I-4-1 : Présentation générale des différents types de détection	36
I-4-1-a : Transducteur mécanique	36
I-4-1-b : Electrochimique	38
I-4-1-c : Optique	39
I-4-2 : Présentation détaillée de la détection optique.....	42
I-4-2-a : Détection optique avec marquage : la fluorescence	42
I-4-2-b : Détection optique sans marquage.....	45
I-4-2-b-1 : Résonance de plasmons de surface : SPR ¹⁷⁴⁻¹⁸⁰	45
I-4-2-b-2 : Diffraction.....	48
I-5 : Conclusion et mise en place du problème	52
I-5-1 : Contexte de la thèse	52
I-5-2 : Couplage industriel	53
I-5-3 : Travail de fond (simulation de la diffraction)	54
I-5-4 : Enjeux biopuce et criblage	57
Références	59
Chapitre 2 : Fabrication des biopuces.....	67
II-1 : Fabrication des moules.....	67
II-1-1 : Moules à motifs nanométriques	67
II-1-2 : Traitement antiadhésif en phase liquide	69
II-2 : Les timbres.....	70
II-2-1 : Propriétés du PDMS	70
II-2-1-a : Propriétés générales.....	70
II-2-1-b : Etude de l'effet du traitement plasma sur le PDMS.....	73
II-2-2 : Les timbres classiques	90
II-2-2-a : Présentation du timbre : propriétés mécaniques	90

II-2-2-b : Utilisation du timbre	92
II-2-3 : Le Macrotimbre.....	94
II-2-3-a : Présentation du macrotimbre.....	94
II-2-3-b : Fabrication du Macrotimbre	95
II-2-3-c : Dépôts et tests réalisés avec le macrotimbre	96
II-3 : Chimie de surface	104
II-3-1 : Chimie de surface pour ADN	104
II-3-2 : Chimie de surface pour peptide	107
II-4 : Les dépôts de molécules.....	110
II-4-1 : Streptavidine	111
II-4-2 : Dendrimères.....	112
II-4-2-a : Timbre hydrophobe.....	113
II-4-2-b : Timbre hydrophile	116
II-4-3 : ADN	123
II-5 : Conclusion.....	124
Références	127
Chapitre 3 : Diffraction.....	131
III-1 : Rappel du principe de diffraction.....	131
III-1-1 : Diffraction d'un réseau en transmission	133
III-1-2 : Diffraction d'un réseau en réflexion	137
III-1-2 : Simulation de la réponse d'un réseau.....	139
III-2 : Présentation du système expérimental : le banc de diffraction.....	146
III-3 : Présentation des résultats	150
III-3-1 : Détection d'une interaction protéine - Anticorps	150
III-3-2 : Détection d'une interaction entre deux brins d'ADN complémentaires.	156
III-4 : Conclusion.....	162
Références	165
Chapitre 4 : Améliorations et ouvertures possibles.....	167
IV-1 : Le dépôt structuré à l'échelle nanométrique sans lithographie avancée	167
IV-1-1 : Déformation du PDMS par traitement plasma Oxygène	167
IV-1-2 : Le transfert de dendrimères par lithographie douce.....	173
IV-1-3 : Possibilités offertes.....	180
IV-2 : Une autre possibilité : les Polymères à Empreintes Moléculaires.....	181
IV-2-1 : Présentation des MIP	182
IV-2-2 : Structuration de MIP par lithographie douce.	183
IV-2-3 : Aspect applicatif : reconnaissance spécifique de la molécule cible.....	195
IV-3 : Conclusion	199
Références	201
Conclusion et perspectives	203

Introduction

L'Homme a toujours voulu repousser les limites, s'affranchir des barrières imposées par ses propres connaissances ou par la nature elle même. L'Homme a voyagé, découvert d'autres terres, d'autres continents, d'autres espèces... Il a observé et appris : se protéger contre les ennemis éventuels, soigner les maladies, devenir plus fort, être mieux préparé. Nous sommes ensuite passés de la survie à la vie : amélioration du quotidien et du confort, élargissement des connaissances sur la médecine et le corps humain... Les maladies ont été identifiées, répertoriées et, dans la mesure du possible, traitées. Savoir reconnaître les pathologies le plus précocement possible a été et reste un challenge. Pour certains types de maladies, comme certains cancers par exemple, l'état de la maladie lors de son diagnostic, est déjà parfois trop avancé pour qu'elle soit traitable. De nouvelles recherches sont alors lancées : découvrir les maladies plus tôt, savoir où et quoi chercher, améliorer les traitements mais aussi les systèmes de détection : meilleure fiabilité, meilleur rendement, rapidité etc. L'Homme repousse encore une fois ses limites.

De grands progrès ont été faits ces dernières décennies pour améliorer le confort du patient, diminuer la « lourdeur » des traitements ou encore accélérer le diagnostic. Cependant, la recherche de la maladie prend toujours beaucoup de temps : en moyenne, les résultats d'une biopsie pour la recherche de cellules cancéreuses (du sein par exemple), peuvent prendre jusqu'à 2 semaines (pour un résultat précis : origine exacte, sensibilité aux antimitotiques). Au-delà de la volonté de guérir la maladie et donc de la prendre à un stade le moins avancé possible, il y a aussi le respect du patient, son confort, son angoisse. Le traitement d'une maladie passe par plusieurs stades. Les symptômes tout d'abord qui mènent à une consultation et si nécessaire à des tests pour rechercher des traces de maladie, des cellules infectées etc. Selon les résultats de ces premiers tests (prise de sang, scanner, échographie...) d'autres peuvent suivre, plus précis et plus ciblés. Dans le cas d'un cancer par exemple, une biopsie est nécessaire pour connaître le type et la nature du cancer afin d'employer le traitement et la médication adaptés. Après ces tests, vient la thérapie : choix des médicaments, des solutions et des techniques qui sont à envisager afin de guérir le patient le plus rapidement

et le moins douloureusement possible. Chaque étape dans la découverte puis dans le traitement d'une maladie est importante, comme décrit ci-après :

- Le diagnostic tout d'abord. Actuellement, la détection est réalisée par analyse globale des cellules, c'est l'anapathologie. Demain, cette opération devra intervenir à l'échelle moléculaire. Dans ce cas, la détection s'effectue par l'interaction biologique entre une molécule « cible » (cellules du patient par exemple) et une molécule « sonde » spécifique et connue, déposée sur un biocapteur (ou une biopuce). Améliorer le système de détection permettrait donc, entre autres choses, de découvrir plus précocement la maladie. En effet avoir une détection plus sensible permettrait de détecter des concentrations plus faibles de molécules cibles.

- Le traitement, lié au criblage pharmaceutique. Ce qu'on appelle médicament est une substance présentant des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies. Ces propriétés sont liées à ce qu'on appelle les « principes actifs ». Dans le but de trouver de nouveaux principes actifs, à travers les propriétés des plantes ou par une recherche purement chimique, il est nécessaire de réaliser de nombreux tests visant à étudier l'efficacité de diverses molécules. Ce grand nombre de tests a lieu par une approche appelée « criblage ».

A l'heure actuelle le diagnostic et la recherche de principes actifs pour le traitement emploient principalement un système de détection basé sur le marquage (fluorescence ou coloration). Les molécules testées ont donc besoin d'être marquées, c'est-à-dire qu'une étiquette (un fluorophore par exemple) doit être liée à la molécule pour permettre de visualiser sa présence. Ce marquage est coûteux et surtout comporte le risque de dénaturer la molécule marquée et donc d'endommager potentiellement ses fonctions, ce qui peut se répercuter sur la qualité de la reconnaissance. Bien que d'autres systèmes aient émergé ces dernières décennies, la détection par marquage reste la plus répandue. De même, le système pour déposer les molécules sondes sur le biocapteur (ou la biopuce), dans le but de procéder à la détection ou au criblage, nécessite souvent l'utilisation d'un robot de dépôt onéreux.

Cette thèse de doctorat propose une nouvelle voie pour l'analyse d'interactions biologiques sans marquage s'appuyant sur des techniques de dépôt et de détection différentes du marché actuel. Ce travail se place dans le cadre d'un projet de développement industriel en partenariat avec la société INNOPSYS et dont l'objectif est de démocratiser l'analyse biopuce

en une solution financièrement accessible aux hôpitaux et aux laboratoires d'analyses et non plus seulement aux seuls organismes de recherche. Nous avons pour cela revu les différentes étapes d'une détection ou d'un criblage :

- Immobilisation de la molécule « sonde » connue sur un support type lame de verre sans robot de dépôt.
- Possibilité de multiplexage grâce à l'immobilisation de plusieurs molécules différentes sur un même support.
- Système de détection :
 - rapide et fiable,
 - ayant un rendement élevé,
 - se passant de marquage,
 - utilisant un volume minimum de « cibles »,
 - capable de détecter le multiplexage.

C'est au travers des différents chapitres de ce manuscrit que nous verrons les solutions proposées pour répondre aux différents objectifs.

En effet, dans la première partie de ce manuscrit, nous verrons l'état de l'art des techniques de structuration des biopuces et des systèmes de détection utilisés à l'heure actuelle. Nous détaillerons en particulier les systèmes de détection optique. Le chapitre II sera consacré à la méthode de structuration choisie : étude des molécules à immobiliser, chimie de surface pour préparer à la fixation de ses molécules, matériau retenu. Nous verrons dans le chapitre III la technique de détection optique sans marquage utilisée ainsi que les premiers résultats obtenus. Enfin le chapitre IV proposera des améliorations potentielles visant à élargir le spectre d'action de la biopuce.

Chapitre I : Etat de l'art :

Biopuce et criblage : de la structuration à la détection

I-1 : Structuration : techniques existantes et utilisées :

La structuration de motifs à l'échelle micro ou nano est une étape clé dans de nombreux domaines de la science moderne. La sphère d'application s'étend de la production de circuits imprimés, la fabrication de Micro Systèmes Electromécaniques (MEMS), à la miniaturisation de capteurs, de dispositifs micro fluidiques en passant, bien sûr, par les biopuces. Il existe plusieurs techniques pour structurer une biopuce : lithographie, jet d'encre, robot de dépôt. Chacune comporte des avantages et des inconvénients qui seront développés et illustrés dans ce chapitre.

I-1-1 : Lithographie avancée

La lithographie avancée est un domaine très vaste¹⁻³, comprenant diverses branches. Il est possible de structurer un substrat de bien des manières différentes, selon la taille des motifs ou selon le coût. Dans le paragraphe « lithographie avancée » nous ne développerons pas toutes les techniques de lithographie existantes, mais nous nous focaliserons sur deux techniques utilisées durant ces travaux de thèse : la photolithographie et la lithographie électronique (e-beam). De manière très simplifiée, le principe consiste tout d'abord en l'enduction de résine sur un substrat de silicium qui sera ensuite exposé, soit aux ultraviolets (photolithographie) soit aux électrons (e-beam).

I-1-1-a : Préparation du substrat

La première chose à faire lors de la structuration d'un échantillon en silicium par lithographie est de bien préparer le substrat. Une poussière ou une goutte d'eau peuvent durement toucher les motifs créés dans le substrat de silicium. Ce dernier doit donc subir divers traitements pour pouvoir être utilisé en lithographie. Il doit en premier lieu être nettoyé (généralement dans un mélange sulfochromique) puis rincé à grande eau. Le substrat est ensuite séché et placé dans une étuve afin d'évaporer toute trace d'eau. Une fois déshydraté, le substrat en silicium peut potentiellement être enduit d'un promoteur d'adhérence. Ce dernier a pour but de faciliter les liaisons entre la résine et le substrat en silicium. Il est à noter qu'il n'est pas obligatoire de déposer un promoteur d'adhérence (généralement de l'hexamethyldisilazane (HMDS)) sur la surface du substrat. Une fois ces étapes réalisées, le substrat est enduit de résine. Afin d'avoir une couche uniforme dont l'épaisseur est contrôlée, la résine est dispersée par enduction centrifuge ou « spin-coating ». La résine appliquée est sensible à un type de radiation qui modifie la structure des chaînes de polymères qui la composent. Par exemple, la résine sera photosensible (sensible aux ultraviolets (UV)) dans le cas d'une utilisation en photolithographie, mais sera sensible aux électrons dans le cas d'une lithographie électronique. Les résines peuvent être classées en deux types de catégorie : positive et négative. Elles vont réagir en opposition lorsqu'elles seront exposées aux radiations. Les résines positives auront une grande solubilité (*sur leurs parties irradiées*) alors que les résines négatives en auront une plus faible. Autrement dit, la zone irradiée des résines positives sera dissoute dans le solvant alors que c'est la zone non irradiée qui sera dissoute dans le solvant dans le cas des résines négatives. (Figure 1.1 et 1.2). Immédiatement après enduction de la résine, le substrat est recuit (de 65° à 120 ° durant 30 à 60 secondes selon le type de résine) afin d'éliminer une partie des solvants. Le substrat est alors prêt à être insolé.

I-1-1-b : Photolithographie

La photolithographie est une technique permettant de projeter à l'aide d'une source lumineuse, l'image d'un masque sur un support photosensible afin de l'y imprimer³. Nous ne détaillerons ici que la photolithographie par proximité utilisée pour ces travaux de thèse et pour laquelle aucun système d'imagerie n'est inséré entre le masque et l'échantillon. Pour cela, un masque de quartz avec des motifs en chrome (opaques aux UV) est placé au dessus

du substrat préalablement préparé (voir I-1-1-a), permettant ainsi au rayonnement UV d'insoler seulement les zones voulues (Fig. 1.1b). L'étape suivante consiste à révéler la résine en trempant le substrat dans un solvant chimique (Fig 1.1c). La solubilité des zones insolées variant selon le type de résine, elles seront (résine positive) ou non (résine négative) dissoutes dans le solvant. La résine restante est ensuite utilisée comme masque, entre autre, pour la gravure chimique ou physique (Fig 1.1d). La gravure utilisée pour ces travaux de thèse était la gravure ionique réactive (RIE) gravure physique. La résine restante est ensuite retirée par traitement chimique (Fig 1.1e).

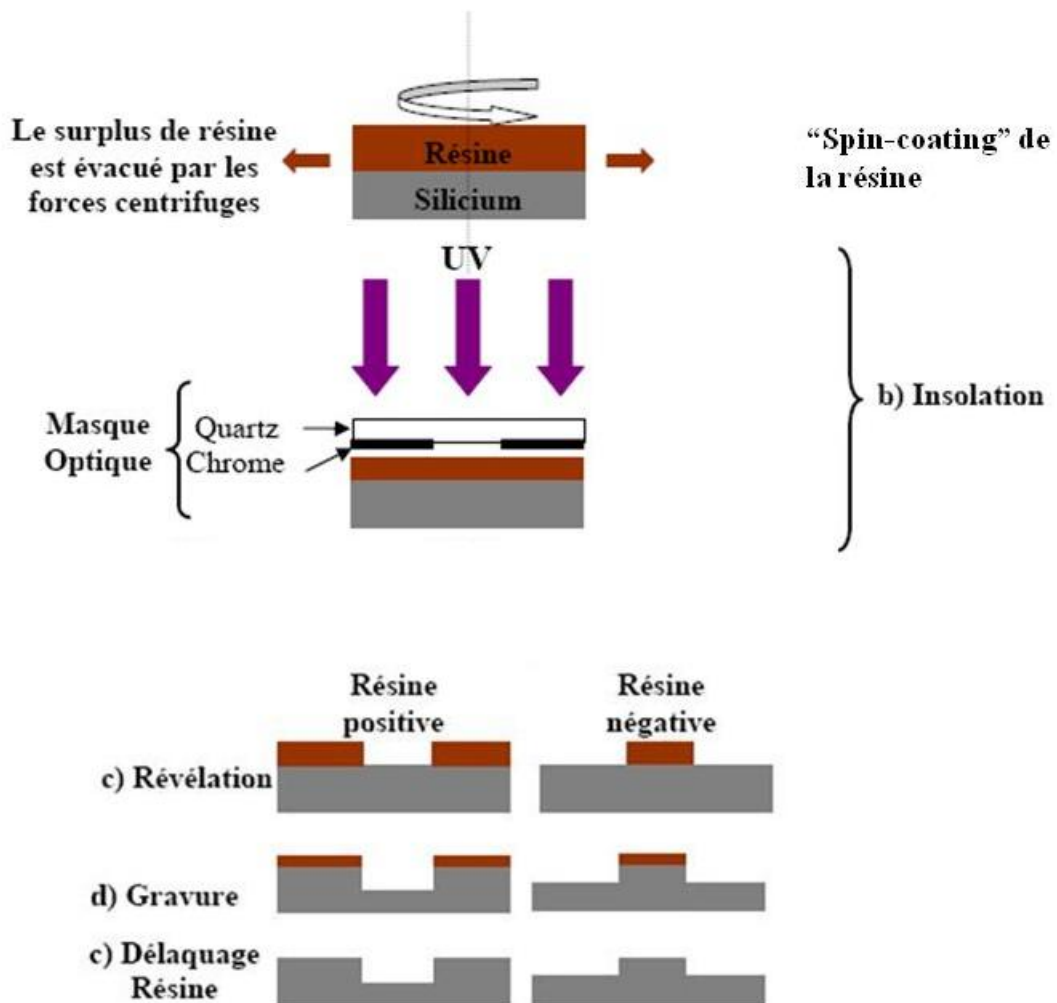


Figure 1.1 : Schéma des étapes de photolithographie. a) « Spin coating » de la résine sur le substrat, b) insolation à travers le masque de photolithographie, c) révélation chimique des différentes résines (positive ou négative), d) gravure chimique et/ou physique, e) nettoyage de la résine restante.

La taille minimale des motifs est limitée par le phénomène de diffraction de la lumière par les motifs du masque. Plus le masque sera proche du substrat, plus la tâche de diffraction projetée sur l'échantillon sera réduite et donc plus grande sera la résolution. Cependant, malgré l'utilisation d'un système sous vide élaboré afin de mettre le masque et le substrat en contact, il est toujours difficile en pratique de réduire la distance entre un masque et un substrat conventionnel à moins de 1 micron sur des surfaces larges (une galette de silicium de 4 pouces par exemple). La résolution est donc limitée, dans nos conditions d'utilisation, autour de 2 μm . Le deuxième inconvénient dans l'utilisation de la photolithographie est qu'elle n'est pas utilisable avec beaucoup de matériaux organiques ou biologiques, en raison de l'incompatibilité des solvants utilisés⁴.

Afin d'obtenir des motifs à l'échelle nanométrique, il est possible d'utiliser la lithographie électronique, plus précisément, la lithographie par faisceau d'électrons localisés (e-beam).

I-1-1-c : Lithographie électronique

Le principe de cette technique est le suivant : un faisceau d'électrons, focalisé dans une sonde de dimension nanométrique, balaye le substrat (Fig. 1.2b) préalablement préparé (I-1-1-a) en suivant un motif précis et préalablement dessiné avec un logiciel adapté. Ce dessin est transformé en une séquence de tensions analogiques qui vont piloter le faisceau d'électrons à l'aide des bobines de balayage du système de lithographie. L'interaction du faisceau d'électrons avec la résine induit un changement local dans la solubilité de la résine. Cette solubilité est due à une modification des liaisons du polymère qui compose la résine, ce qui permet de créer les motifs insolés (résine positive) ou leur inverse (résine négative) (Fig. 1.2c). Après révélation, sur le même principe qu'une photolithographie, le substrat est gravé chimiquement ou physiquement (Fig 1.2d) puis délaqué : c'est-à-dire nettoyé de sa résine restante.

Moules nanométriques

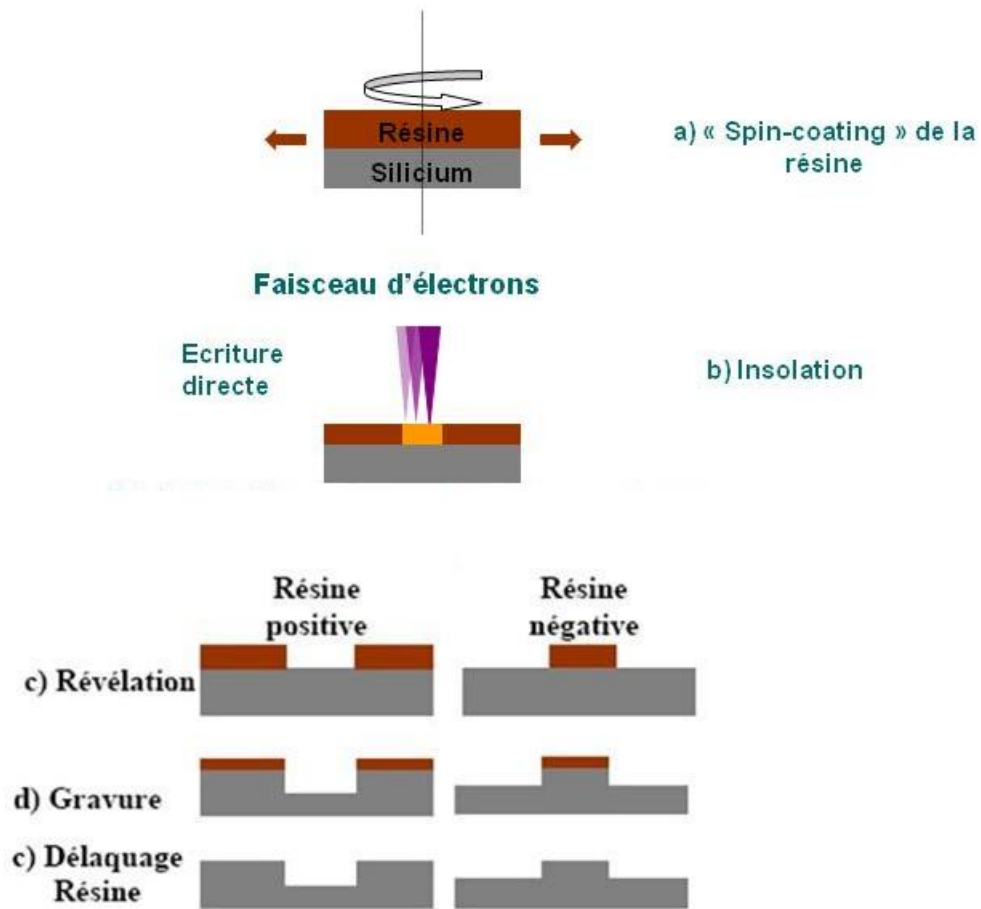


Figure 1.2 : Schéma des étapes de lithographie électronique. a) « Spin-coating » de la résine sur le substrat, b) insolation par écriture directe sur la résine, c) révélation chimique des différentes résines (positive ou négative), d) gravure chimique et/ou physique, e) nettoyage de la résine restante.

La faible longueur d'onde associée à la grande énergie du faisceau d'électron permet d'avoir une très haute résolution ainsi qu'une très grande précision d'écriture⁵. Grâce à l'e-beam, il est donc possible d'obtenir des motifs de géométrie variée pouvant descendre jusqu'à quelques nanomètres. Cependant, l'écriture reste assez lente car utilisant une méthode en série (motifs insolés les uns après les autres par opposition à la photolithographie : insolation en parallèle), et le coût d'utilisation d'un tel procédé demeure élevé.

La lithographie pouvant seulement être appliquée à la structuration d'un nombre restreint de matériaux (comme les résines photosensibles ou électro-sensibles), son emploi s'en trouve forcément limité. Les techniques utilisées, relativement lentes et onéreuses, rendent la lithographie avancée, notamment la lithographie électronique, pratique pour faire quelques copies de l'échantillon original mais l'élimine de la production de masse. Cependant, les originaux créés peuvent être ensuite utilisés comme moules dans un procédé de reproduction afin de transférer les motifs rapidement, pour concevoir, à bas coût et avec une haute précision, des répliques dans d'autres matériaux.

L'association d'une écriture « haute résolution » avec une réplique du moule mère à bas coût semble fournir la technique la plus facile et la mieux adaptée à la fabrication en masse de nanostructures.

I-1-2 : Lithographie douce ou « soft-Lithography »

La lithographie douce englobe de nombreuses techniques : micro contact printing⁹ (μ CP), micro transfert molding^{8, 23} (μ Tm), Nano imprint lithography (NIL)⁹, edge printing⁹, Micromolding in capillaries (MIMIC)^{7, 8} etc. Par souci de concision toutes ces techniques ne seront pas développées dans ce manuscrit. Nous nous focaliserons sur les méthodes les plus proches de celles utilisées dans ces travaux de thèse, qui sont des techniques adaptées à l'utilisation de molécules biologiques délicates.

I-1-2-a : Principe de la Lithographie douce

La lithographie douce⁶⁻⁸ est un domaine très vaste comprenant nombre de techniques qui répondent aux critères suivants : simplicité, rapidité et faible coût. Introduite par Whitesides et al dans les années 90, la lithographie douce a depuis été largement développée⁹⁻¹¹. La majorité des techniques rassemblées sous la bannière « lithographie douce » font appel à un concept identique : un timbre en élastomère, formé à partir d'un moule mère (généré par photolithographie ou e-beam), est utilisé pour structurer un matériau. Grâce à ce procédé de fabrication, il est possible d'obtenir de multiples copies d'un moule mère original d'une manière rapide et économique. Le principe de fabrication est expliqué sur la figure 1.3. La première étape est la fabrication du moule, par lithographie avancée (voir I-1-1) (Fig. 1.3a). Ce moule est généralement fait en silicium en raison de la très grande quantité de surface des

plaques de silicium (plaques de 4 pouces généralement employé durant ces travaux de thèse) et de la disponibilité de procédés de gravure ionique fiables et reproductibles sur ce matériau (technologie issue des MEMs). Le timbre, généralement constitué d'un mélange de pré polymères, est ensuite coulé sur le moule (Fig. 1.3b). Dans la majorité des procédés de lithographie douce, le polymère de prédilection pour réaliser les moules est le polydimethylsiloxane (PDMS). Après l'étape de réticulation (thermique ou UV), qui a pour but de rigidifier le timbre, il est démoulé (Fig. 1.3c). Le timbre peut ensuite être utilisé pour structurer la surface d'un substrat avec une grande variété d'encres. L'introduction d'élastomères facilite la préservation des structures (pouvant descendre jusqu'à l'échelle nanométrique) du moule originel. Il est ainsi possible de faire des centaines de moulages successifs sans abimer le moule mère.

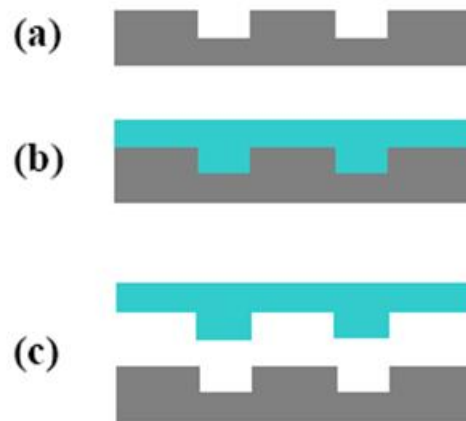


Figure 1.3 : *Principe de fabrication d'un timbre en polymère.*

La lithographie douce offre des avantages dans des domaines où la lithographie avancée est limitée. Les encres pouvant être déposées sont très nombreuses : protéines¹²⁻¹⁵, peptides, bactéries¹⁶, dendrimères¹⁷⁻¹⁸, Acide Désoxyribo Nucléique (ADN)¹⁹.... et les substrats pouvant être structurés peuvent être incurvés, non plan, rugueux avec une chimie de surface très variable : or¹⁰, epoxy, verre, SiO₂²⁰⁻²¹.....

Le succès de cette technique repose sur le contact conforme entre le substrat et le timbre et sur la rapide formation (moins de 1 min) de monocouches ordonnées de l'encre choisie.

La lithographie douce permet donc la structuration de façon homogène, sur une large zone, à l'échelle micrométrique ou nanométrique²², d'une grande variété de substrat avec de nombreux types d'encres, à moindre coût.

I-1-2-b : Les différentes lithographies douces

Selon le type de lithographie douce, les motifs ne seront pas structurés de la même manière. Ils peuvent être construits, par exemple, par moulage ou par impression. L'impression regroupe des techniques comme le $\mu\text{CP}^{9,10}$ ou le μTm^{23} . Le moulage quant à lui, rassemble les technologies de NIL⁹, d'UV imprint, de MIMIC^{7,8} etc. Dans cette partie ne seront développées en détail que les techniques d'impression.

Dans les deux cas cités, un timbre en élastomère est fabriqué comme expliqué précédemment, puis, une fois démoulé, est encre pendant un temps très court (Fig. 1.4b) (généralement inférieur à 1min) avec une encre choisie (ce que nous appelons encre est l'association du solvant et de la molécule que nous souhaitons déposer). Le timbre est ensuite séché sous flux d'azote pour enlever l'excès de solution (Fig. 1.4 c), puis déposé sur la surface d'un substrat (Fig. 1.5). Aucune pression n'est appliquée sur le timbre lors de la mise en contact. Une telle pression risquerait d'élargir les motifs déposés (Chapitre 2 : II-2-2-a). L'étape de dépôt est aussi très courte. En effet, 1 à 2 minutes sont en général suffisantes pour permettre à l'encre de se déposer sur la surface du substrat.

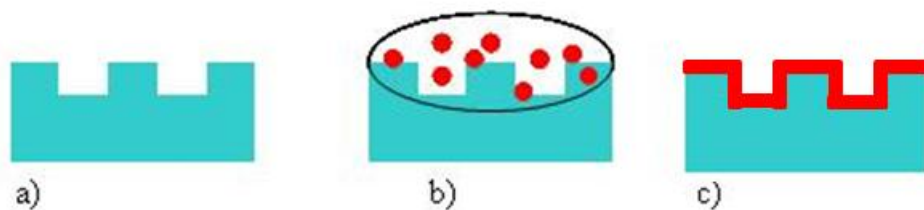


Figure 1.4 : *a) Schéma du timbre après avoir été démoulé du moule en silicium ; b) encrage du timbre pendant un temps généralement < 1min ; c) Le timbre après séchage sous flux d'azote. Seule une fine couche d'encre reste à la surface du timbre.*

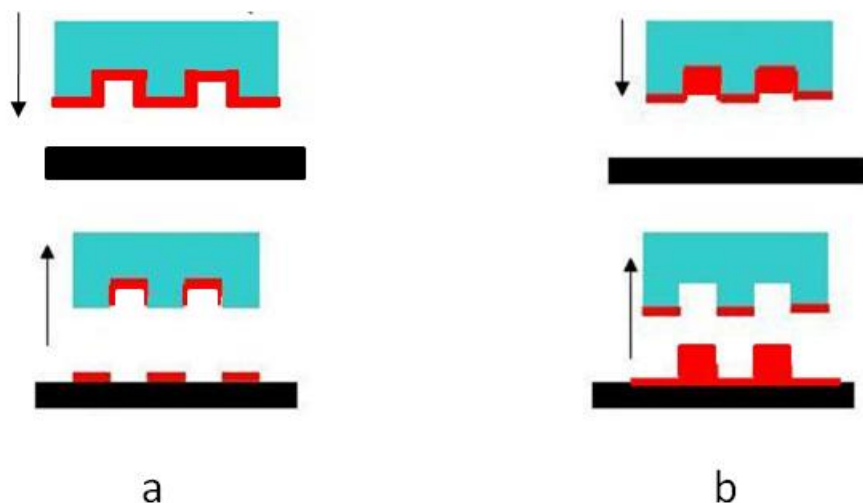


Figure 1.5 : *principe du a) μ CP ; b) μ Tm.*

Bien qu'extrêmement proche du μ CP, le μ Tm donne des résultats différents. En effet, comme décrit sur la figure 1.5 a et b, les motifs obtenus avec le μ CP sont le négatif des motifs obtenus par μ Tm: le μ CP structure la surface du substrat exactement selon les motifs protubérants du timbre (Fig. 1.5 a), alors que le μ Tm structure le substrat selon les motifs creux du timbre (Fig. 1.5 b).

La géométrie du timbre est telle que seules les protubérances de ce dernier touchent la surface (chapitre II), cependant les résultats obtenus sont différents selon la répartition spécifique de l'encre sur le timbre. Cette différenciation se joue au niveau du type d'encre et des propriétés physico-chimiques du timbre qui conduisent à une répartition différente de l'encre à la surface du timbre. Afin de faciliter la compréhension, je vais prendre l'exemple de deux timbres absolument identiques, ayant pour motifs des réseaux de lignes de 200nm de large (protubérances) au pas de 1 μ m (cavités de 800 nm de large).

μ CP :

Lors du μ CP²⁴, le timbre va fonctionner comme un tampon encreur : le principe est exactement le même que celui de l'imprimerie de Gutenberg. Les molécules, lors de l'encre, vont s'adsorber sur la surface du timbre formant ainsi une couche uniforme. Elles ne pénètrent pas à l'intérieur du timbre (Fig. 1.6 a). Elles seront donc déposées selon les protubérances du timbre (Fig. 1.5b). Avec l'exemple de notre timbre, nous obtiendrons sur la surface des lignes de molécules de largeur : 200nm au pas de 1 μ m (Fig. 1.6b)

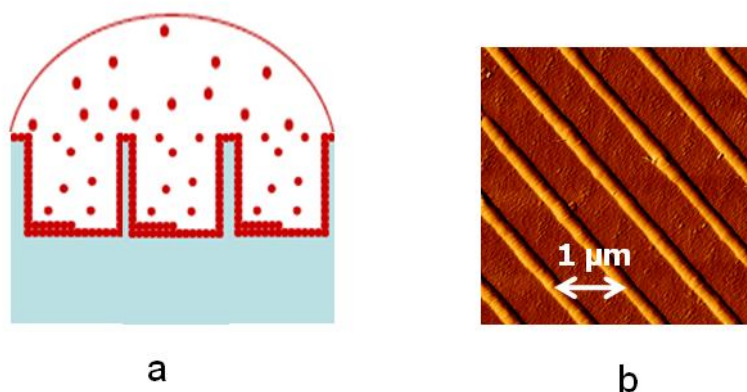


Figure 1.6 : a) Principe d'encrage lors du μ CP. Les points représentent les molécules. Elles se déposent de façon homogène sur la totalité de la surface formant ainsi une ou plusieurs couches. b) Image AFM d'un dépôt de dendrimères réalisé par μ CP en utilisant un timbre ayant un réseau de lignes de largeur 200nm. Les lignes de dendrimères structurés sur le substrat ont une largeur de 200 nm.

μ Tm :

Dans ce cas-ci, l'élastomère va voir sa structure modifiée par action du solvant lors de l'encrage. L'élastomère va se gonfler sous l'effet du solvant, générant ainsi un démouillage des surfaces vers le fond des cavités (fond des motifs du timbre) (Fig. 1.7a). Ce processus peut se passer spontanément durant l'encrage, ou peut être spécifique à certaines molécules. En général, la surface du timbre est frotté afin d'enlever le surplus de solution des protubérances du timbre. Au final, lors du dépôt les molécules sont déposées selon l'inverse des motifs (Fig. 1.5c). Le résultat obtenu sera donc des lignes de 800 nm au pas de 1 μ m (Fig. 1.7b). Il est à noter que la résolution est la même que pour le μ CP.

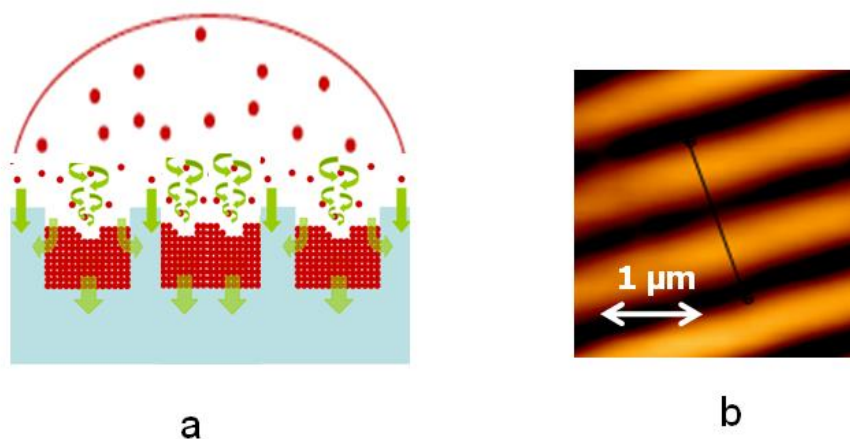


Figure 1.7 : a) Principe de l'encrage lors du μ Tm. Les molécules (représentées ici par les points) sont « envoyées » des surfaces vers les cavités par démouillage. Les flèches représentent les flux de solvants pénétrant dans le timbre. Les molécules s'adsorbent dans le fond des motifs du timbre, pour être ensuite redéposées sur la surface suivant cette adsorption .b) Image AFM d'un dépôt de dendrimères réalisé μ Tm en utilisant un timbre ayant un réseau de lignes de largeur 200nm. Les lignes de dendrimères ont une largeur de 800 nm.

Bien que les exemples de motifs donnés ici ne soient que des réseaux de lignes, les motifs pouvant être générés par lithographie douce sont très nombreux. En effet, il est possible de structurer des motifs arbitraires. (Fig. 1.8)

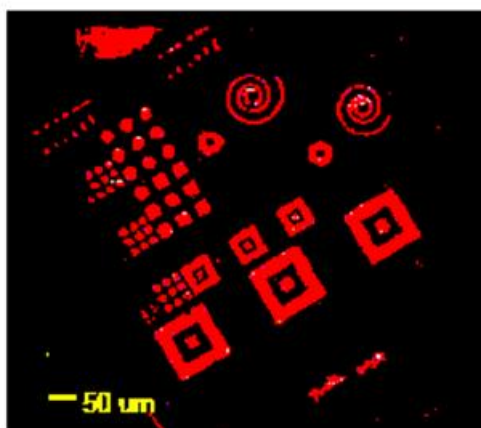


Figure 1.8 : d'après [19]. Exemple de motifs pouvant être réalisés par lithographie douce avec des oligonucléotides fluorescents (35-mers ; $[C] = 10 \mu M$).

De nos jours, toutes ces techniques sont largement utilisées et dans différents types de domaines. Leur domaine de prédilection reste la biologie : dépôt de protéines²⁵, d'anticorps²⁶, d'ADN etc. bien qu'elles soient aussi utilisées en microélectronique²⁷, ou encore dans des procédés industriels comme pour la fabrication des écrans plats²⁸.

Grace à ces techniques, il est possible de créer des motifs inférieurs à 100nm avec de nombreuses molécules^{26,29}. L'équipe de Georges Whitesides a d'ailleurs réussi récemment à créer des structures de seulement 2 nm grâce au μ CP²². Le μ CP peut être utilisé pour la structuration de surfaces telles que des lames de verre^{30, 31} couramment utilisées en biologie. Cette partie sera développée dans le chapitre 2 (II-2-3).

Pour que le processus de dépôt fonctionne, l'encre doit avoir une plus forte affinité avec le substrat qu'avec le timbre, c'est pourquoi la chimie de surface du substrat est toujours étudiée et reconsidérée selon l'encre choisie. Cette partie sera développée lors du chapitre II (II-3).

La lithographie douce est donc une méthode très utile pour la structuration de motifs moléculaire à l'échelle micrométrique ou nanométrique. Elle permet en effet de contrôler le dépôt de molécules, que ce soit par la géométrie du dépôt (contrôle des motifs), par le type de molécules déposées ou par la quantité de molécules déposées (densité de molécules plus importante qu'avec un robot de dépôt¹⁹). Cette méthode est peu coûteuse, car nécessitant des matériaux peu onéreux (les élastomères utilisés pour former le timbre sont bon marché) et rapide (moins de 1minute par action). De plus, la concentration des molécules utilisées peut être faible. En effet, Christophe Thibault et al¹⁹, ont démontré que l'utilisation d'une concentration d'une solution d'ADN 100 fois plus faible permet d'obtenir un résultat au moins équivalent si ce n'est meilleur qu'avec des technologies telles que le robot de dépôt (I-1-4) couramment utilisé par les laboratoires pour, entre autres, la fabrication de biopuces. La rapidité et la fiabilité de dépôts, la diversité des motifs pouvant être obtenus, la large gamme de molécules et de surfaces pouvant être structurées ainsi que le faible coût (matériaux et faible concentration) font de la lithographie douce un outil très utile dans la génération de motifs moléculaires à l'échelle nanométrique ou micrométrique.

D'autres techniques, hormis la lithographie avancée et la lithographie douce, sont à l'heure actuelle utilisées par les laboratoires ou par les industries pour la structuration de

substrat par des molécules. Deux d'entre elles seront présentées dans les prochains paragraphes.

I-1-3 : Jet d'encre

Le principe du jet d'encre³²⁻³³, aussi connu sous le nom « d'ink jet technology », est basé sur la technologie des imprimantes. Un réservoir, surmontant une buse, est rempli d'une solution contenant la molécule à déposer (Fig. 1.9). La buse, intégrant un élément piézo électrique, est soumise à une tension, entraînant la déformation de cet élément. Le but de cette déformation est d'exercer une pression sur le réservoir contenant la molécule, éjectant ainsi une goutte de liquide sur le substrat. L'ensemble des 2 est placé sur un automate programmable. Il est ainsi possible de faire de multiples dépôts selon une disposition contrôlée à haute cadence.

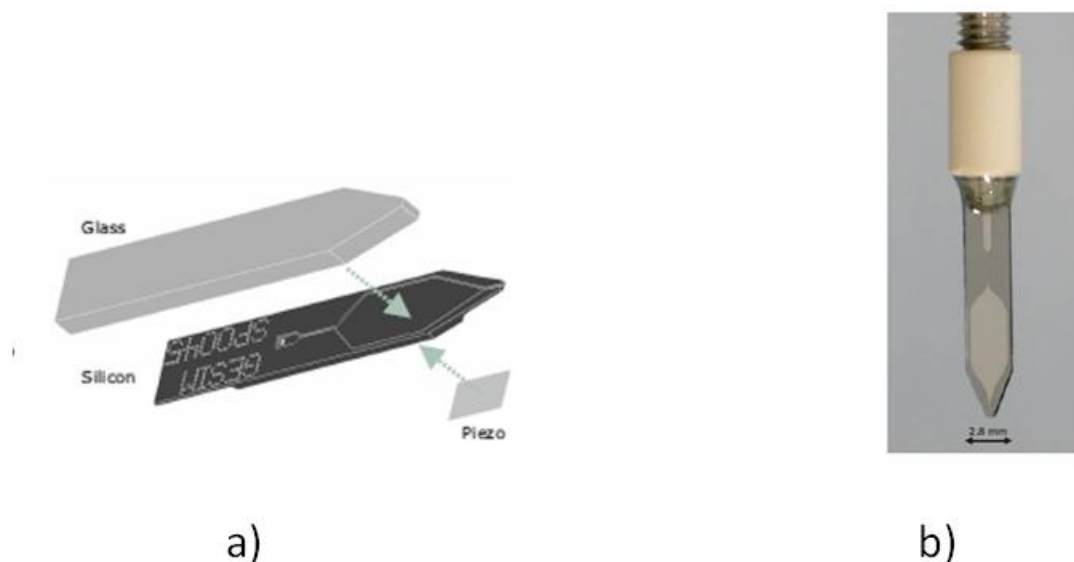


Figure 1.9 : d'après [34]. a) schéma des différents éléments constitutifs de la buse ; b) photographie d'une buse utilisée par l'automate.

Le jet d'encre permet de structurer un substrat sur une grande densité (40 000 dépôts sur une lame de verre) avec une large gamme de molécules (ADN, Anticorps...). Cette technologie permet entre autre la formation des brins d'ADN, nucléotides après nucléotides directement sur la surface³⁵⁻³⁶ (I-2-2-a-2). Les dépôts se faisant par projection il n'y a pas contact entre la surface et les éléments piezo électrique, permettant ainsi une durée de vie de l'ensemble buse/élément piezo relativement longue. Les gouttes éjectées sont de l'ordre de 100 pL pour un diamètre de 10 μm ^{33,37}.

Cependant, des liquides trop visqueux ne peuvent être utilisés avec cette technologie et le problème du chargement de la tête ainsi que de son nettoyage peut se poser. Cette méthode étant séquentielle (le nombre de dépôt réalisé en même temps est limité par le nombre de buses), elle est relativement lente.

Cette technologie, malgré les inconvénients cités ci-dessus, présente dans l'ensemble des avantages non négligeables (taille et densité des spots, coût). Elle est d'ailleurs utilisée dans diverses industries : Incyte pharmaceutical³⁸ (CA, USA), Protogène (CA, USA), Agilent³⁶ (USA) etc.

I-1-4 : Robot de dépôt

Le robot de dépôt permet par contact la formation de gouttelettes sur la surface d'un substrat³⁹. Cette technique fait appel à des aiguilles métalliques ayant le même principe que celui d'un stylo plume, mais de tailles millimétriques (Fig. 1.10). Un réservoir, dont la taille peut varier, et un canal fluide sont intégrés dans les aiguilles, elles mêmes disposées sur un automate (Fig. 1.10). L'espacement des aiguilles correspond à celui des puits d'une microplaque de titration utilisée en laboratoire. Ainsi, il est possible de remplir les réservoirs des différentes aiguilles avec des liquides différents, dans le même temps. Le principe du dépôt se décompose en 4 étapes :

1. Remplissage des aiguilles en les plaçant dans les puits de la microplaque
2. Dépôts sur les substrats à structurer
3. Nettoyage des aiguilles
4. Séchage du substrat

Un point important lors de la conception d'un robot est d'obtenir à la fois une vitesse rapide et une grande précision avec le minimum de vibration. La taille des dépôts dépend, comme dans le cas du jet d'encre, de la taille des aiguilles. Ils peuvent varier de 50 à 300 μm de diamètre, ce qui correspond à des volumes de gouttes de l'ordre du nL. Les dépôts réalisés par le robot sont homogènes et leur densité est inférieure à 10 000 dépôts par lame. Pour améliorer la densité, un robot de dépôt baptisé « bioplume » a été développé au LAAS-CNRS^{40, 41} grâce aux technologies MEMS ayant permis une miniaturisation des aiguilles. Ce robot permet le dépôt de gouttes ayant un volume de l'ordre du pico au femto litre,

correspondant à un diamètre de 10 à 1 μm et permettant donc un plus grand nombre de dépôts par lame. Ce robot devrait être prochainement commercialisé.

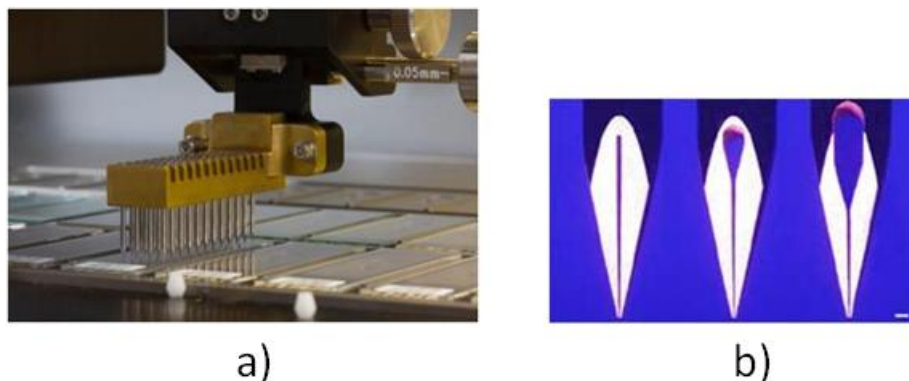


Figure 1.10 : *d'après [109] a) photographie d'un automate de dépôt de gouttes composé d'aiguilles métalliques, b) aiguilles avec trois réservoirs différents.*

Certains paramètres doivent être considérés avec attention. En effet l'humidité, la robotique (le contrôle du parallélisme, de la force de contact), le type d'aiguille et sa fabrication (précision de la gravure) sont des facteurs très importants à ne surtout pas négliger sous peine de voir ses dépôts abîmés ou contaminés⁴², tout comme le chargement du réservoir ainsi que son nettoyage^{43, 44}. De plus, tout aussi important sont les paramètres chimiques : la chimie de surface et la solution tampon, qui influenceront sur la taille et l'homogénéité des dépôts.

Toutes ces techniques sont utilisées dans la fabrication de biopuces mais aussi dans la fabrication de micro ou nano structures. Elles sont plus ou moins répandues selon le résultat que l'on souhaite obtenir, selon l'argent investi ou selon le but final.

Afin de concrétiser les différents types de structuration qui viennent d'être exposées, nous allons à présent voir les biopuces et les biocapteurs : les différentes « sortes », leur intérêt, les voies de structuration, les formes sous lesquelles il est possible de les trouver ...

I-2 : Présentation biopuce/biocapteur

Les biopuces (aussi appelées « microarray »), ou les biocapteurs (aussi appelés « biosensors »), sont constitués de réseaux ordonnés de molécules biologiques sur un substrat, utilisées pour la détection de biomolécules et le criblage à haut débit⁴⁵⁻⁴⁷ domaines continuellement en expansion et d'un intérêt considérable⁴⁸⁻⁴⁹: analyse de gène, détection d'agents pathogènes, détection de mutations à l'échelle moléculaire.

Une tendance récente, conduit vers la miniaturisation, ce qui permettrait d'accroître le rendement ou encore les domaines d'applications (tests cliniques, large gamme d'analyses médicales, sécurité⁵⁰ etc.). Le principe de fonctionnement est simple : un ligand, ou « sonde » (connu) est accroché sur un substrat puis mis en contact avec un analyte ou « cible » (inconnu).

La différence entre la notion de biopuce et de biocapteur est mince et souvent laissée à appréciation. La biopuce peut être considérée comme le support pour l'immobilisation de la couche biologique alors que le biocapteur, lui, va permettre la détection d'interaction mais sans forcément avoir le support pour l'immobilisation. Dans l'absolu, la notion générale d'une puce est celle d'un multicapteur (récepteur et transducteur). Durant les prochains paragraphes, nous allons nous attarder sur les biopuces. Mais ce qui sera expliqué pour les biopuces (méthode de fabrication) sera aussi valable pour les biocapteurs, c'est pourquoi nous parlerons plus généralement de puce. Elles peuvent être divisées en deux catégories : puce à ADN⁵¹⁻⁵² et puce à protéines.

I-2-1 Les différents types de puces

I-2-1-a : Puce à ADN

En 1989, dans l'institut de recherche d'une entreprise néerlandaise, Affymax, à Palo Alto (Californie), une équipe de jeunes chercheurs dirigée par le biochimiste Stephen Fodor inventa un prototype issu de la rencontre entre la technologie des semi-conducteurs et la biologie moléculaire : la puce à ADN. En quelques années, l'invention prit un envol fulgurant : adoubée par la communauté scientifique suite à sa publication dans Science, en 1991, le premier modèle fut mis sur le marché en 1994 par la société Affymetrix (Santa Clara) que Fodor avait cofondée avec Affymax deux ans plus tôt.

Une puce à ADN est un ensemble de molécules d'ADN fixées sur une surface (Fig. 1.11). Cette biotechnologie récente permet, par exemple, de quantifier le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule d'un tissu donné (foie, intestin etc.), à un moment donné (embryon, adulte etc.) et dans un état donné (sujet malade, sujet sain).

La structure de l'ADN et le rôle de la molécule d'ADN dans le support et transport de l'information lors de la reproduction des cellules a été décrit par Watson et Crick en 1953⁵³.

L'ADN est constitué par un enchainement séquentiel de 4 nucléotides différents composés eux-mêmes par un ensemble de base et de sucre. Les 4 bases utilisées sont : l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Ces quatre molécules (appelées aussi « base de l'ADN »), ont la particularité de s'unir deux à deux par des liaisons hydrogènes, en créant la fameuse «double hélice» de l'ADN. Le principe de la puce à ADN repose sur la particularité de reformer spontanément la double hélice de l'acide désoxyribonucléique face au brin présentant une séquence parfaitement complémentaire (Fig. 1.11).

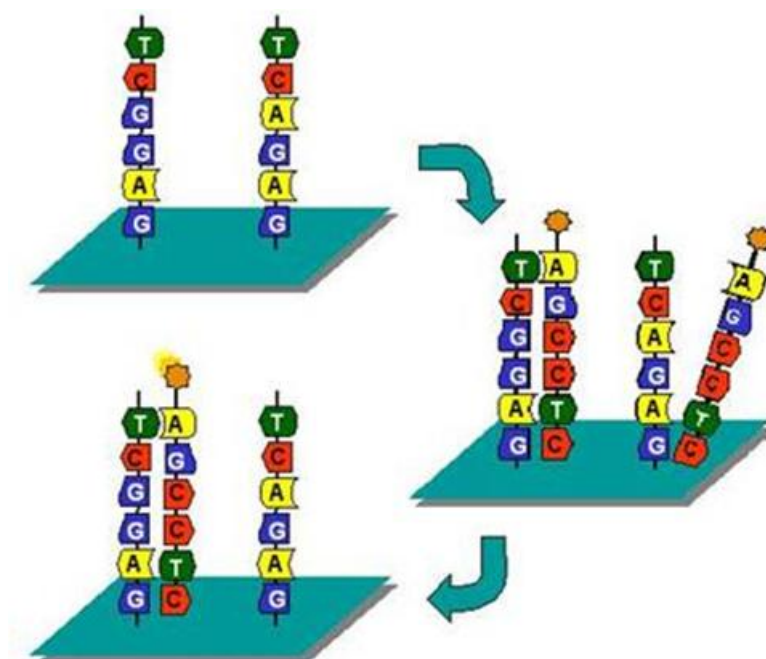


Figure 1.11 : *Principe de l'hybridation : représentation schématique d'une portion de puce à ADN. L'ADN analysé est marqué par un fluorochrome.*

L'invention des puces à ADN a permis l'étude simultanée de milliers (à des dizaines de milliers) de gènes en une seule expérience⁵⁴⁻⁵⁷. Mais les puces à ADN⁵⁸ servent aussi au diagnostic de maladies⁵⁹, à la recherche toxicologique⁶⁰, à la détection de microorganismes⁶¹, ou encore à l'étude du comportement des composants cellulaires.

I-2-1-b : Puce à protéine⁶²⁻⁶⁶

La première puce à protéine a été réalisée par l'équipe de Michael Snyder en 2000⁶².

Une puce à protéine est un ensemble de protéines (antigène, peptide, enzyme etc.) fixées sur une surface. Certaines protéines pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour diagnostiquer certaines pathologies comme le cancer. Pour cela, sur une même puce, sont fixées, par un lien chimique approprié, des protéines sondes génétiquement produites (purifiées) pour permettre la reconnaissance des protéines cibles de l'échantillon à analyser.

La fragilité des protéines et leur tendance à se dénaturer de manière irréversible limite la portée et les conditions des réactions de couplage, ce qui a pour effet d'augmenter les difficultés de préparation des puces à protéines par rapport aux puces à ADN. En effet, l'ADN est une molécule stable et uniforme et, a contrario, les protéines sont fragiles et hétérogènes⁶⁷. La fonctionnalité d'une protéine étant dépendante de l'état dans lequel elle se trouve (de sa forme ou conformation), le risque majeur lors de la fabrication des puces est la modification ou la dénaturation des protéines⁶⁸⁻⁷¹. En effet, la fonction biologique d'une protéine étant intimement liée à sa forme, il est possible que la liaison entre la protéine et le substrat modifie la conformation de cette dernière ce qui tend à réduire son activité et son aptitude à fixer sélectivement la cible recherchée. Une protéine modifiée, dite dénaturée, ne peut généralement plus assurer sa fonction⁷².

Les protéines ne peuvent pas être synthétisées sur une surface mais peuvent être déposées, indirectement, par leur adsorption sélective sur des surfaces fonctionnalisées spécifiquement pour les fixer de manière robuste.

Ils existent deux formes de puce à protéines : la puce analytique et la puce fonctionnelle.

La puce analytique :

Elle est utilisée pour détecter l'expression de protéines connues dans un échantillon complexe selon le principe d'une interaction antigène/anticorps⁷³⁻⁷⁵. Deux possibilités s'offrent alors (Fig. 1.12 haut):

la protéine à étudier est fixée sur le support puis est reconnue par un anticorps dont on cherche à établir le dosage. Cette méthode permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons et la détection d'une seule protéine par support.

La protéine cible se fixe sur un anticorps sonde préalablement fixé sur la lame. Cette méthode permet la détection de plusieurs protéines par support en analysant un seul échantillon.

La puce analytique permet d'explorer une banque d'anticorps ou d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques.

La puce fonctionnelle :

Elle est utilisée pour identifier des partenaires protéiques potentiels inconnus (Fig. 1.12 bas). Un grand nombre de protéines purifiées sont fixées sur un support, des interactions spécifiques (protéine/protéine ; protéine/arn....) sont ensuite analysées.

La puce fonctionnelle constitue un outil pour identifier de nouveaux médicaments et de nouvelles cibles thérapeutiques.

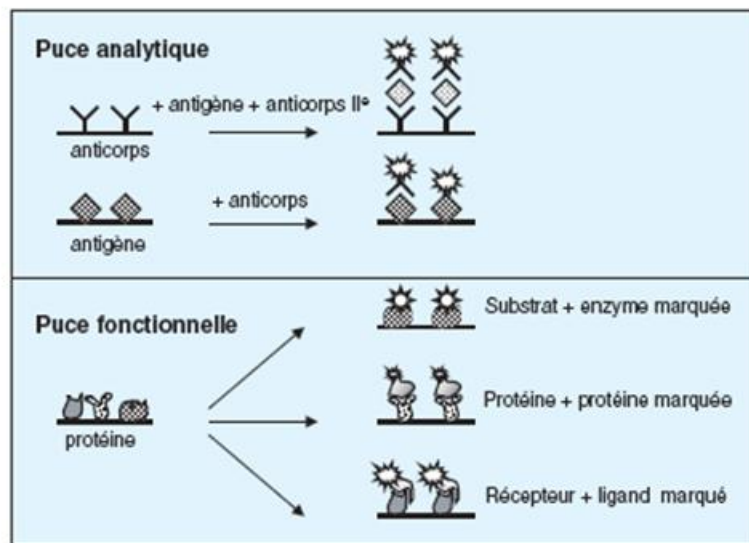


Figure 1.12. D'après [64]. Types de biopuces à protéines :

En haut : Les puces analytiques étudient les interactions immunologiques entre une protéine connue et des anticorps par dépôt premier de la protéine (bas) ou par réalisation d'une technique sandwich (haut).

En bas : Les puces fonctionnelles analysent l'interaction entre une protéine sélectionnée et des partenaires qu'elles cherchent à identifier.

La découverte des biomarqueurs, qui est étroitement liée au développement de médicaments, constitue un domaine de prédilection pour les puces à protéines. En effet, ces dernières peuvent permettre d'accélérer la recherche de bio marqueurs pour la thérapie et le diagnostic. Dans certains domaines comme le cancer⁷⁶ ou les maladies auto immunes⁷⁷ les puces à protéines ont déjà fait leurs preuves. Elles restent cependant moins utilisées que les biopuces à ADN à cause de leur fragilité.

Dans le développement des biopuces, les techniques d'immobilisation peuvent être regroupées en deux catégories : d'un côté le dépôt de la sonde déjà synthétisée sur une surface chimiquement activée (« synthèse ex situ »), et de l'autre côté la synthèse de la sonde directement sur la surface (« synthèse in-situ »)⁷⁸⁻⁷⁹.

I-2-2 : Les différentes voies de synthèse

Trois conditions sont nécessaires à l'immobilisation de la sonde sur la surface : la chimie de surface doit être stable, la sonde doit être fonctionnelle après immobilisation, et les biomolécules doivent être immobilisées avec une orientation et une configuration appropriées⁸⁰.

Dans la suite de cette section, seront présentées la voie de synthèse in situ, soit la fabrication directement sur la surface de la sonde, puis la synthèse ex situ, soit le dépôt sur la surface de la sonde déjà synthétisée. Il est à noter que les puces à protéines ne sont fabriquées que par synthèse ex-situ. En effet, il est impossible de synthétiser une protéine élément après élément comme il est possible de le faire avec l'ADN. Cependant, l'assemblage in situ de peptides reste possible.

I-2-2-a : In situ

Comme vu précédemment, la synthèse in situ⁸¹⁻⁹¹ permet la synthèse de brins d'ADN directement sur la surface, nucléotides après nucléotides. Il existe deux grandes voies de synthèse in situ : la photolithographie et le jet d'encre.

I-2-2-a-1 : La photolithographie

Deux grandes compagnies utilisent la photolithographie pour construire leur puce à ADN : Affymetrix⁹² et Nimblegen⁹³. Les 4 bases de l'ADN sont déposées successivement dans l'ordre qui caractérise la séquence de la sonde que l'on souhaite obtenir, sur le substrat. Cette opération est réalisée par un procédé de photo déprotection localisée grâce à un jeu de masques⁹⁴⁻¹⁰⁰, (Affymetrix : figure 1.13) ou par l'effet d'un miroir digital¹⁰¹ (Nimblegen : figure 1.14)

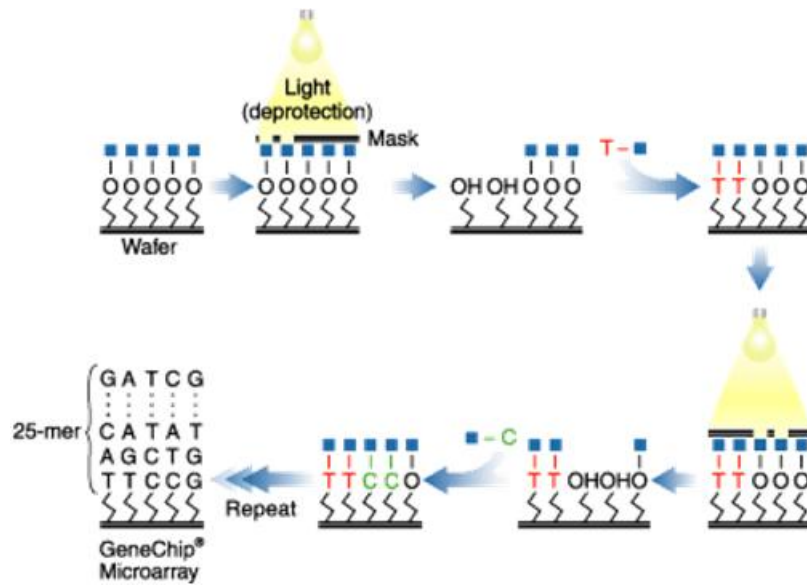


Figure 1.13: d'après [92]. Principe du procédé d'Affymetrix. Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photosensible. L'illumination au travers d'un masque déprotège des plots spécifiques. Il est alors possible de procéder au greffage d'un premier nucléotide. Le procédé est réitéré jusqu'à la synthèse complète des ADN sondes. Les jeux de masques utilisés lors de chaque niveau définissent les séquences synthétisées en chaque point image de la puce.

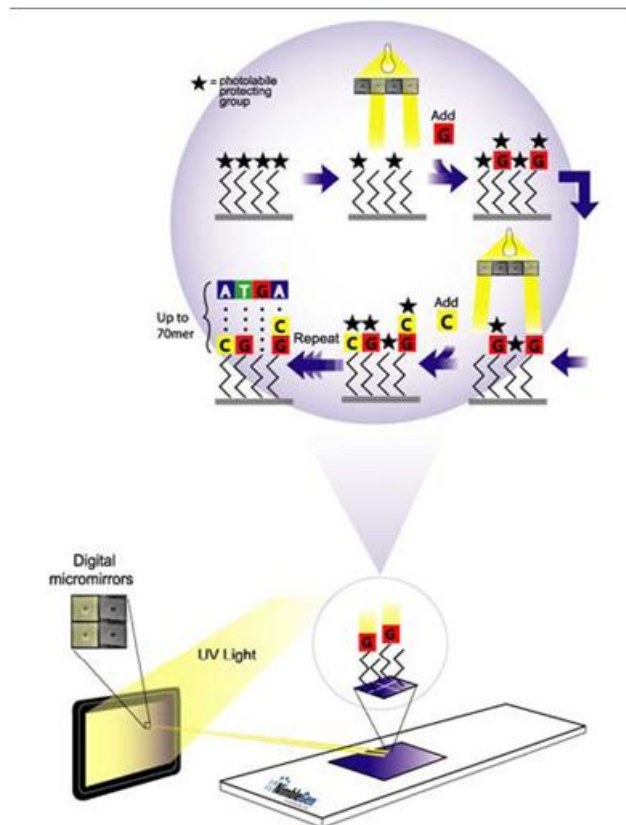


Figure 1.14: d'après [93]. Principe du procédé de Nimblegen. Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photosensible. L'illumination au travers d'un miroir digital servant de masque déprotège des plots spécifiques. Il est alors possible de procéder au greffage d'un premier nucléotide. Le procédé est ensuite répété jusqu'à la synthèse complète des ADN sondes. La programmation du miroir digital lors de chaque niveau définit les séquences synthétisées en chaque point image de la puce.

La différence entre les deux procédés se trouve dans l'illumination. Affymetrix utilise des masques en verre recouverts de manière sélective de chrome (I-1-1-b) afin de ne laisser passer la lumière qu'aux seuls endroits non protégés du masque. Nimblegen utilise un miroir digital composé d'une matrice de micro miroirs adressables, où chaque pixel peut être soit transparent soit réfléchissant.

Ce miroir est un avantage non négligeable: il est plus économique qu'un jeu de masque car plus flexible dans la modification.

Le procédé de photolithographie permet une densité sur puce de 500 000 groupes d'oligonucléotides par lame de verre⁹² ainsi que le choix des séquences étudiées. Il n'est pas

besoin de préparer, vérifier et cataloguer les brins sondes. De même, il n'y a pas de risque de mélange des tubes. Les séquences d'ADN ne sont pas les mêmes partout : l'utilisation de plusieurs détecteurs différents pour la même molécule augmente donc grandement le ratio signal sur bruit et permet de réduire le nombre de faux positifs. De plus le degré de reproductibilité est très élevé dû à la spécificité du processus.

Cependant, le processus de photolithographie est assez rigide, surtout dans le cas d'Affymetrix. Le jeu de masques ne permet pas d'ajuster les sondes ou d'incorporer de nouveaux designs : il faut pour cela faire un nouveau jeu de masque à chaque fois, ce qui est onéreux. Il est à noter que pour construire un brin contenant N nucléotides, il faudra 4^N niveaux. La taille des dépôts est de l'ordre de 20 μm , et celle des sondes utilisant le procédé de photolithographie est réduite : pas plus de 25 nucléotides, ce qui est faible pour un monobrin, pouvant être constitué de plus de 1000 nucléotides. Des risques de problèmes d'alignement sont aussi à prendre en compte. Le processus bien qu'extrêmement précis, est onéreux et lent, ce qui en exclut l'utilisation pour les laboratoires de recherches de petite ou moyenne envergure.

Ces technologies sont adaptées à des puces de haute densité destinées au séquençage complet d'organismes vivants, mais restent peu compatibles avec le marché de l'analyse médicale grand public en raison d'un coût prohibitif.

I-2-2-a-2 : Jet d'encre

La technologie jet d'encre¹⁰²⁻¹⁰⁷, comme expliqué précédemment (I-1-3), agit comme la technologie des imprimantes couleur, où l'on a remplacé l'encre par des nucléotides. Cette technologie est utilisée par la société Agilent (Fig. 1.15)³⁶.

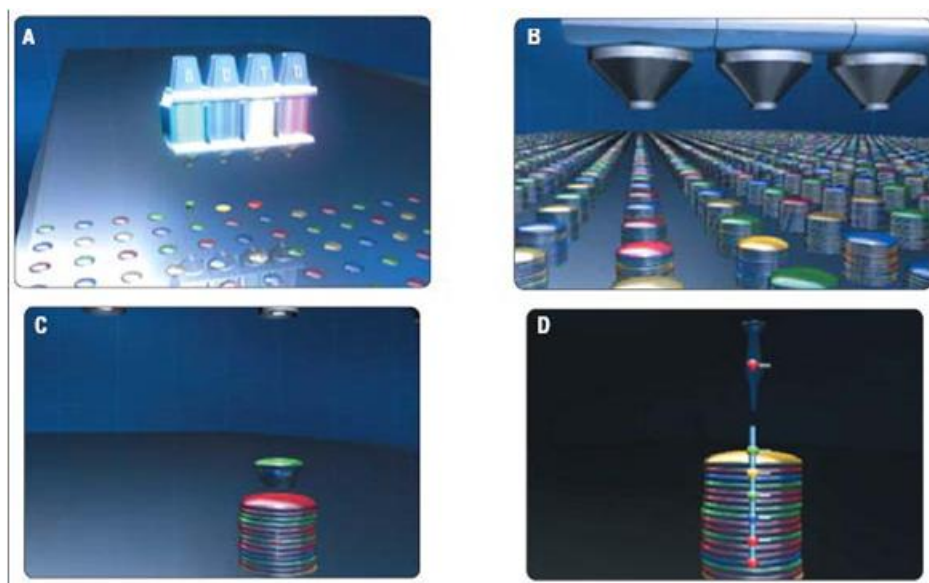


Figure 1.15 : d'après [36]. Méthode de synthèse in-situ de la société Agilent. A : un premier dépôt constitué du premier nucléotide est effectué sur la surface activée de la puce. B superposition des différents nucléotides. C et D : zoom sur un spot en cours de fabrication.

Cette méthode permet de construire, goutte après goutte (nucléotide après nucléotide), un monobrin d'ADN sur le substrat. Cette technologie permet d'avoir une densité de 40 000 dépôts par lame. Bien qu'elle soit moins résistante pour le moment que la photolithographie, le jet d'encre a l'avantage de ne pas avoir de système de masque, mais simplement 4 nucléotides différents dans des réservoirs différents, dont l'assemblage peut commencer dès que l'ordinateur a acquis la séquence à synthétiser. Cependant, les brins d'ADN sont composés au maximum de 60 nucléotides, ce qui reste petit pour une molécule de ce type. La calibration à chaque boucle (ou « run ») est aussi très importante afin de ne pas avoir d'oubli dans les dépôts.

La synthèse in situ est réservée aux puces à ADN, puisque le principe de cette composition est basé sur la fabrication d'un brin d'ADN nucléotide après nucléotide. L'ADN étant formé uniquement de la combinaison de 4 nucléotides avec une structure bien définie et de forme linéaire, il est possible de les former par la voie in situ, contrairement aux protéines qui ont une structure complexe et un arrangement tridimensionnel. Les acides aminés composant la protéine, peuvent générer des milliers d'enchainements différents, il est donc impossible de créer les puces à protéines par cette voie, mais uniquement par la synthèse ex-situ, qui va être étudiée à présent.

I-2-2-b : Ex situ

La synthèse ex-situ consiste à préparer tout d'abord toutes les sondes purifiées puis à les adresser sélectivement sur les substrats des puces. Cette synthèse a deux principaux avantages : elle permet la conception de puces à protéines¹⁰⁸, et les brins sondes d'ADN peuvent être long, formés potentiellement de plus de 1000 nucléotides. Les sondes étant préalablement caractérisées, elles sont donc plus fiables. Il devient donc possible d'utiliser également des fragments de PCR (Polymerase chain reaction). Cette voie utilise les technologies de dépôt avec ou sans contact : le robot de dépôt (I-1-4)¹⁰⁹⁻¹¹³ et le jet d'encre (I-1-3)¹¹⁴⁻¹¹⁵.

En plus de ces deux principaux avantages, ces techniques sont peu chères par rapport à la photolithographie, rapides et plus flexibles. Les échantillons doivent toutefois être synthétisés, purifiés et stockés de manière rigoureuse. La taille des dépôts restent aussi un facteur limitant qui borne généralement la densité des supports à 10 000 dépôts par puce. Ce rendement est moins bon que la technologie d'Affymetrix, mais il est possible d'espérer, avec les progrès de la mécanique, une productivité plus intéressante dans les années à venir⁴¹.

La figure 1.16 résume dans les grandes lignes les différentes voix de synthèse : photolithographie, robot de dépôt, jet d'encre.

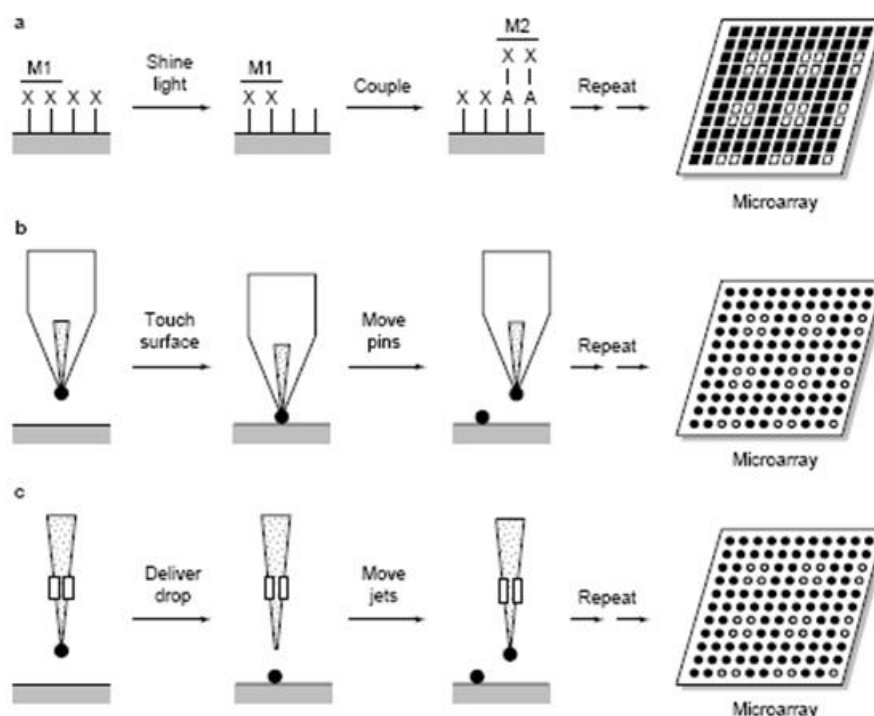


Figure 1.16 : d'après [87]. Résumé des différentes voix de synthèse. a): par photolithographie : synthèse *in situ*. b) : par robot de dépôt : synthèse *ex situ*. c) : par jet d'encre : synthèse *in et ex situ*.

Il existe d'autres types de fabrication de biopuce¹¹⁶, *in et ex situ*, non présentées ici car d'utilisation moins fréquente et non compatible avec une production de masse actuellement.

Au vue de l'intérêt grandissant des biopuces et de leurs impacts sur le développement des médicaments ou du diagnostic médical, il paraît difficile de dire qu'une seule de ces technologies dominera le secteur de l'industrie. Une solution alternative serait la combinaison des différentes techniques : celles présentées ou non, pour profiter au mieux des avantages de chacune. Un point capital est toutefois à signaler. La pénétration massive de la technologie biopuce dans le marché de l'analyse médicale dépendra en grande partie de la possibilité d'utiliser des méthodes et des équipements automatiques de faible coût, de la fiabilité des tests ou encore du contenu biologique. Le coût d'une analyse biopuce reste aujourd'hui trop élevé pour rendre son utilisation fréquente voire systématique pour l'analyse médicale.

I-2-3 : Les différents supports

Généralement les biopuces sont faites sur des substrats solides et non poreux. Les premières biopuces étaient faites sur des supports en nylon et bien que ce type de support soit toujours utilisé il a été remplacé majoritairement par des lames de verre (type microscope) ou des puits. Ce sont ces deux derniers supports qui seront étudiés dans cette partie.

I-2-3-a : Lame de verre

Les lames de verres sont les substrats les plus utilisés de nos jours pour les biopuces. Leurs avantages sont multiples : faible coût, matériel durable, résistance aux hautes températures, lavable en bain ionique, format standard pour les lecteurs⁶³, même chimie de surface que le silicium oxydé pour lequel de nombreuses chimies ont été développées. Elles peuvent être utilisées dans les deux voies de synthèse : in-situ¹⁰² ou ex-situ¹¹⁷. Les échantillons sont attachés de manière covalente à la lame de verre préalablement traitée avec une chimie de surface adaptée (II-3). Cependant, les molécules déposées sur la lame de verre ont un haut taux d'évaporation et les risques de cross contamination ne sont pas nuls. Pour résoudre ces problèmes il est possible d'utiliser du gel sur les lames¹¹⁸⁻¹²³.

L'utilisation du gel comme support augmente la capacité d'immobilisation des oligonucléotides¹²¹ ou des protéines¹²³ et facilite l'hybridation ainsi que la distinction des mutations. Il permet d'éviter l'évaporation ainsi que la dénaturation des protéines. De plus, le gel a un faible taux de fluorescence et accroît la sensibilité des mesures. Il permet d'avoir une réaction plus homogène. On pourra citer le gel polyacrylamide couramment utilisé¹²² dans la fabrication de biopuce. Cependant, le gel impose une restriction sur la taille de l'ADN qui peut diffuser : il faut utiliser des petits morceaux d'ADN¹¹⁹.

Bien que les lames de verre soient les substrats les plus communs et utilisés pour les biopuces, d'autres types de substrat peuvent être utilisés : des micros puits¹²⁴⁻¹²⁵.

I-2-3-b : Micros puits

Le domaine d'application des micros puits est très vaste¹²⁴⁻¹²⁸ : biopuce (synthèse in et ex situ) mais aussi criblage pharmaceutique (I-3). Les micros puits peuvent être des plaques de titrations classiques ou peuvent être fabriqués en PDMS¹²⁸ (contrôle de la taille plus

important dans ce cas qu'avec les plaques de titration). Dans le dernier cas, un moule mère est fabriqué par photolithographie, gravé (la profondeur des puits dépendant de cette gravure), puis utilisé comme moule avec du PDMS. Il est à noter que d'autres polymères peuvent être utilisés. Ces méthodes sont devenues récemment une voie attractive dans la fabrication de biopuces grâce à leurs larges propriétés physiques et chimiques¹²⁶. Elles ont l'avantage sur les plaques de titration d'utiliser de plus petits volumes, et d'avoir un meilleur ratio signal/bruit. En effet, la taille est contrôlée et les micros puits permettent à de petits volumes, d'analytes différents, d'être stockés en grande densité sur une simple puce.

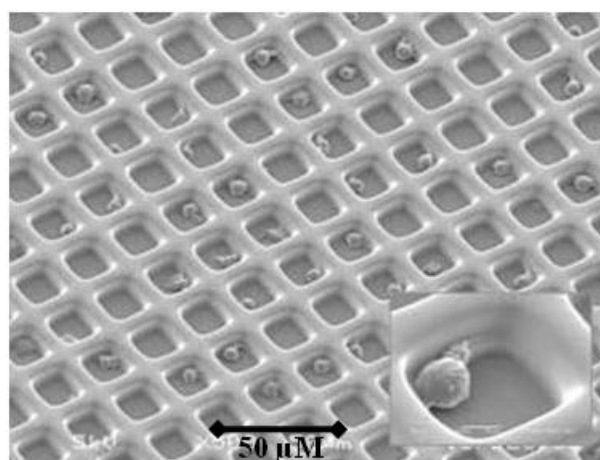


Figure 1.17 : *d'après [130]. Image MEB de micros puits.*

Les avantages des puits sont multiples : peu d'évaporation des molécules, absence de cross contamination (Fig. 1.17), compatibilité avec les lecteurs standards... Toutefois un alignement s'avère nécessaire⁶³. Il est de même complexe de changer les tampons et de récupérer les molécules piégées dans les trous. Il est à noter qu'il est possible de connecter des puits à des fibres optiques, observables ainsi indépendamment des autres; ou de faire directement les puits avec des fibres optiques. Le cœur de ces dernières est gravé pour former des micros puits capables d'accueillir des microsphères pouvant être couplées à des molécules. Il est bien sûr possible d'utiliser du gel dans les micros puits. Il est à noter qu'il existe aussi des nanos puits¹³¹, mais encore au stade de modèle expérimental.

Il existe donc différentes formes de biopuces/biocapteurs selon l'utilisation que l'on souhaite en faire, selon ce que l'on cherche à détecter ou à trouver. Les méthodes de fabrication ainsi que les supports dépendent du coût mais aussi de ce qui doit être analysé.

Nous allons, à présent, introduire le criblage pharmaceutique, qui se développe en parallèle des biopuces. Parallèle car, bien que les mêmes types de dépôts soient utilisés (majoritairement, utilisation du robot de dépôt), ainsi que les même types de supports (micro puits), le but n'est pas le même : le criblage pharmaceutique concerne la recherche thérapeutique contrairement aux biopuces qui assurent plus une fonction d'analyse génomique ou diagnostique.

I-3 : Criblage pharmaceutique

Depuis 1995, la France est le premier pays producteur de médicaments de l'Union Européenne¹³². Le groupe Sanofi-Aventis domine le marché de la pharmacologie avec 15 % des parts. Cependant de nombreux autres groupes existent aussi. On pourrait citer entre autre Servier, Astrazeneca ou encore Pierre Fabre. Ces groupes s'intéressent principalement à la recherche de médicaments.

On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies. La recherche thérapeutique (de médicaments) se fait principalement par deux méthodes : un inventaire des produits naturels contenus dans les plantes ou une chimie thérapeutique. Dans le premier cas, on va sur le terrain, on récolte des plantes, les identifie, les classifie, puis on isole la molécule active de l'échantillon. Une fois cette molécule isolée, on en fait varier la structure en étudiant sa variation d'activité biologique. Il est alors possible de cultiver la plante (si la molécule efficace est celle d'origine) ou de synthétiser (en entier ou partiellement) la molécule efficace. Dans le deuxième cas, on part d'une molécule A, à partir de laquelle on synthétise un grand nombre de molécules analogues, puis des analogues d'analogues, et ainsi de suite, jusqu'à aboutir à une molécule intéressante, soit la molécule Z qui reprend de A une partie de sa structure (par exemple un noyau aromatique) mais avec une activité plus forte. En effet, un même motif chimique peut aboutir à des fonctions très variées.

Cette recherche n'est pas ciblée, elle demande donc un criblage pharmaceutique considérable, en anglais *screening* : une suite de nombreux essais et erreurs.

Le criblage pharmaceutique vise, en fait, à étudier l'effet de composés chimiques sur certains fonctionnements cellulaires (normaux ou pathologiques). Il met en œuvre des robots (Fig. 1.18) (I-1-4) capables d'accélérer et d'automatiser des étapes de mise en contact de molécules potentiellement actives en pharmacologie (candidats médicaments) avec un

système biologique qui reproduit certains aspects du fonctionnement cellulaire d'un organisme vivant ou de son dérèglement (maladie). Ce criblage à haut débit (*high throughput screening*) est un processus très rapide : il permet de tester des dizaines voire des centaines de milliers de molécules (en provenance de la nature ou de la synthèse chimique) avec des cibles pharmacologiques en très peu de temps (quelques semaines voire quelques jours)¹³².



Figure 1.18 : D'après [133]. Photographie du système Kibron CM Ceecker pour le criblage pharmacologique à haut débit.

Afin d'être plus concret, prenons un exemple de criblage : le test de l'efficacité d'inhibition de l'activité d'une enzyme : la kinase *HCK*, vis-à-vis de son substrat, un peptide-*Src*. Sans inhibiteur et en présence d'ATP (Adénosine Triphosphate) en solution, la kinase va phosphoryler les peptides-*Src* (Fig. 1.19). Les peptides sont dits phosphorylés lorsque qu'un des groupements phosphate (PO_3) présent sur l'ATP va se transférer sur le peptide. On obtiendra alors de l'ADP (Adénosine Diphosphate) et des peptides phosphorylés (Fig. 1.19). Il est possible de limiter ou de contrer cette phosphorylation avec l'ajout dans la solution d'un inhibiteur qui peut être une molécule médicament candidate. En effet les kinases sont impliquées dans une grande variété de voies de signalisation et de fonctions de la cellule. C'est ici que le criblage pharmaceutique va entrer en jeu : les peptides seront déposés dans des puits (I-2-3-b) par un robot (I-1-4), puis la kinase, l'inhibiteur et l'ATP seront rajoutés.

On parle ici de criblage car plusieurs inhibiteurs chacun à différentes concentrations seront déposés dans les puits, ce qui correspond à de très nombreuses expériences et donc à la nécessité d'avoir recours au criblage.

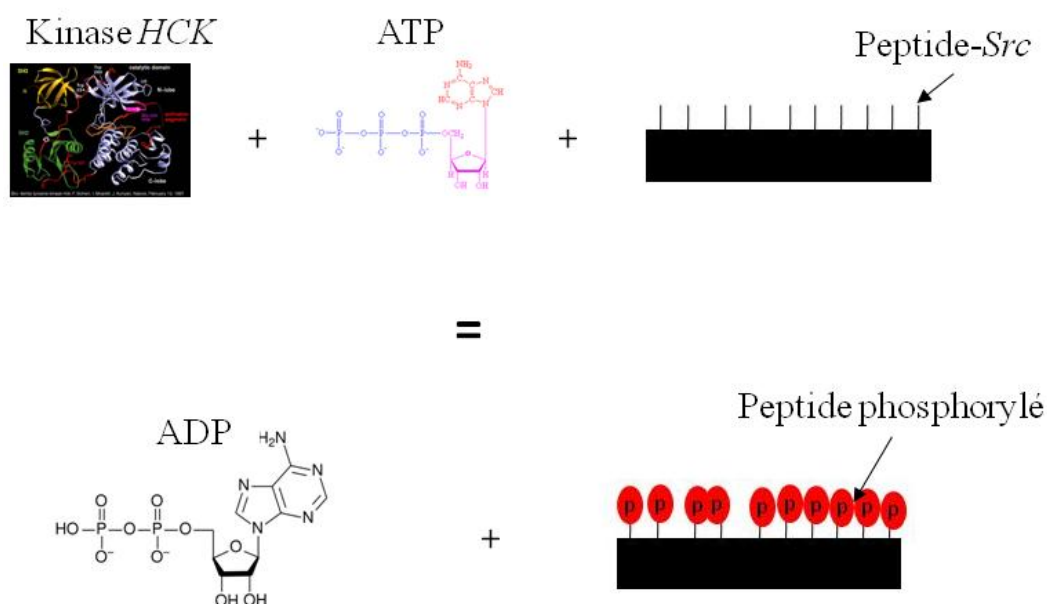


Figure 1.19 : schéma de la phosphorylation d'un peptide-*Src* par une kinase *HCK* en présence d'ATP.

Le principal problème du criblage pharmaceutique est que, de 100 000 molécules criblées à 10 qui feront l'objet d'un dépôt de brevet et une qui parviendra à passer toutes les étapes de tests et d'essais cliniques, le chemin de l'innovation est long jusqu'au malade (12 ans en moyenne), complexe et coûteux (la mise au point d'une nouvelle molécule peut représenter un investissement pouvant aller jusqu'à 800 millions d'euros¹³²). De plus, le format utilisé par les entreprises pharmaceutiques pour le criblage est standardisé. En effet, toute l'automatisation s'est développée autour du format micro-plaque très largement utilisé par les biologistes. Ce format contraint les entreprises à avoir un nombre restreint de molécules à tester (les plaques ont soit 96 soit 1536 puits). En plus de la perte de liquide dans les puits, du volume utilisé par le robot tout d'abord mais aussi par les plaques, les molécules doivent être marquées afin de pouvoir être détectées (I-4). Au final, ce processus est très coûteux et nécessiterait une amélioration dans le but d'optimiser le système et d'en réduire son coût. Une bonne planification des recherches et du développement, activités clés de l'industrie pharmaceutique, permet d'agir sur ce délai : chaque gain de temps représente un bénéfice

potentiel et améliore la rentabilité d'une molécule. Par ailleurs, des nouveaux procédés tels que la biotechnologie ou la chimie combinatoire peuvent diminuer les délais et coût de la recherche.

Le principe du criblage, bien que différent de celui des biopuces, reste dans la même trame : une interaction entre deux molécules doit être détectée lorsqu'elle a lieu.

Nous avons vu précédemment, les différents moyens de préparer les biopuces (support/structuration). Nous allons, à présent, étudier des techniques utilisées pour la détection d'interaction, c'est-à-dire, la détection de la liaison entre une molécule cible et une molécule sonde. Durant la prochaine section, certaines des techniques les plus couramment utilisées seront présentées.

I-4 : Détection d'interactions

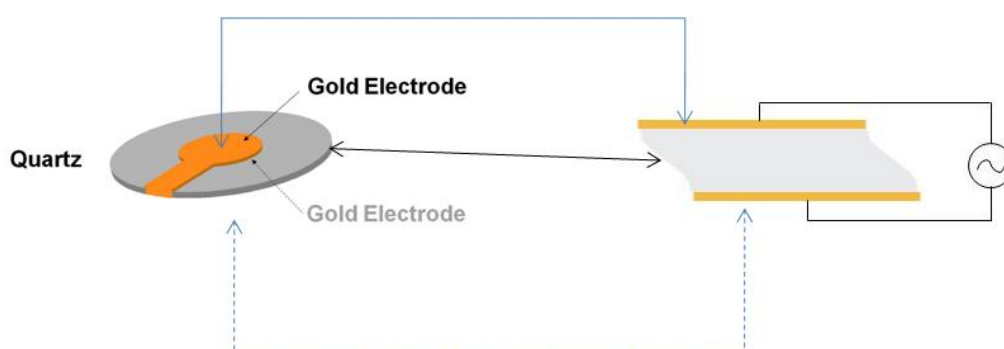
I-4-1 : Présentation générale des différents types de détection

La reconnaissance spécifique d'analytes est assurée par la couche biologique de la biopuce. Cependant, cette reconnaissance doit être traduite par la biopuce en un signal physiquement mesurable. C'est le rôle assuré par le transducteur. Ils existent différents types de transducteurs pour détecter une interaction entre 2 molécules. De manière générale, ils peuvent être regroupés en trois catégories : transducteur mécanique¹⁴⁴⁻¹⁴¹, électrochimique¹⁴²⁻¹⁴⁵ ou optique¹⁴⁶⁻¹⁵⁰.

I-4-1-a : Transducteur mécanique

En général, la transduction mécanique est basée sur la génération et la détection d'ondes mécaniques^{133,139} ou acoustiques^{135,136}. Comme une onde se propage au travers ou à la surface d'un matériau, un changement au niveau de la zone de passage de l'onde propagée affectera sa vitesse et/ou son amplitude. Les variations de la vitesse de l'onde, induites typiquement par une variation de masse, peuvent être suivies par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique. La Micro Balance à Quartz (QCM)¹³⁴⁻¹⁴⁰ est un des moyens de détection mécanique les plus utilisés (Fig. 1.20 a). Le cristal de quartz est excité à sa fréquence de résonance (par effet piezo-

électrique) à 5MHz . La proportionnalité entre la variation de f et la variation de la masse à la surface du quartz permet, par suivi en temps réel de la fréquence, la reconnaissance d'interaction (Fig. 1.20 b). L'immobilisation des molécules induit aussi un amortissement des mouvements du quartz (donc du signal), ce qui se répercute par une variation du paramètre de dissipation D (Fig. 1.20 c). Ce paramètre est ainsi représentatif des propriétés viscoélastique de la couche immobilisée. La limite de détection de la QCM pour un anticorps est proche de $1 \mu\text{g/mL}^{151}$.



a) Schéma représentant un disque de quartz avec des électrodes d'or

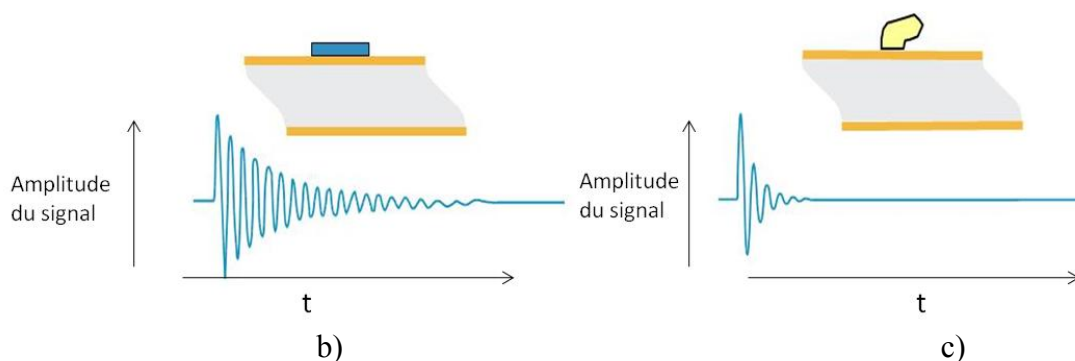


Figure 1.20 : Schéma (a) et principe de fonctionnement (a,b,c) d'une microbalance à quartz avec suivi de la dissipation (D). b) cas où le film immobilisé sur le quartz est rigide. La variation de l'amplitude du signal en fonction du temps nous renseigne sur la masse immobilisée sur la surface du quartz. c) cas où le film immobilisé est « mou ». La variation de l'amplitude du signal en fonction du temps nous renseigne aussi sur la viscoélasticité de la couche (courtoisie de Q-sense)

I-4-1-b : Electrochimique

Les méthodes de transduction électrochimique sont populaires dans le domaine des biocapteurs, entre autre, pour la simplicité des principes mis en jeu. Ces techniques sont en adéquation avec la miniaturisation recherchée à l'heure actuelle, grâce à leur niveau d'intégration et leur compatibilité avec les techniques de fabrication dérivées de la microélectronique. Cette catégorie de détecteur peut être sous divisée en trois parties :

Les détecteurs potentiométriques : ils traduisent les variations de potentiels au niveau d'électrodes, causées par des ions ou des réactions chimiques. La figure 1.21 est un exemple de transducteur potentiométrique largement utilisé, le transistor à effet de champ sensible aux ions (ISFET), principalement utilisé dans le commerce comme capteur de pH. La limite de détection de ce système est de 10 pM.



Figure 1.21 : *Principe de fonctionnement d'un ISFET par transduction potentiométrique. Ici le transistor sert à mesurer le potentiel de la grille biosensible.*

Parmi les systèmes les plus avancés, il est à noter que l'équipe de C. Lieber à Harvard a démontré la possibilité d'utiliser des nano fils entre la source et le drain afin de réaliser des capteurs de pH ultra sensibles¹⁵².

Les détecteurs ampérométriques : ils détectent le courant électrique associé aux électrons générés lors d'une réaction d'oxydoréduction¹⁵³⁻¹⁵⁴. Le principe est similaire à celui de la figure 1.21 (immobilisation de bio récepteurs sur une électrode de travail et présence d'une électrode de référence) mais dans ce cas, l'interaction avec l'analyte va provoquer une réaction directe ou indirecte de type redox, générant un courant dans le système. Ces dispositifs sont sensibles, rapides et peu onéreux.

Les détecteurs conductimétriques : ils mesurent les changements d'impédance électrique entre deux électrodes, où les variations peuvent provenir à une interface ou dans la région comprise entre les deux électrodes (Fig. 1.22)¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. La simplicité de fabrication provient de l'absence d'électrode de référence.

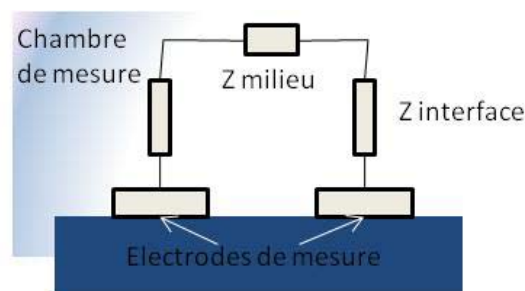


Figure 1.22: Principe de la transduction par conductimétrie.

L'inconvénient de ces détecteurs se trouve dans la mesure de deux types d'impédance. En effet, si les changements doivent être mesurés à l'interface des électrodes, la composition du milieu dans la région entre les électrodes (la force ionique par exemple) peut perturber les mesures. C'est pourquoi malgré la simplicité du principe de détection, des optimisations sont nécessaires afin d'améliorer la sélectivité de la détection. La limite de détection de ce système de mesure est de 5nM.

I-4-1-c : Optique

Il existe de nombreuses techniques optiques pour détecter des interactions biologiques, que l'on peut déjà classer en deux catégories : avec et sans marquage. Il faut entendre par là, que certaines détections optiques vont nécessiter le marquage d'une molécule (très schématiquement, cela revient à lui mettre une sorte d'étiquette) afin de pouvoir détecter l'interaction. Citons par exemple la fluorescence, une des techniques avec marquage la plus connue et la plus utilisée. Cette méthode sera développée plus amplement par la suite (I-4-2). Il est à noter que les détections mécaniques et électrochimiques s'affranchissent de manière générale de marquage. Dans la section qui suit, nous verrons certaines techniques de détection optique, sans marquage, plus ou moins utilisées à l'heure actuelle selon le rendement, la fiabilité et la précision de leur détection.

Ellipsométrie : analyse fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane^{146-147, 157} (Fig. 1.23).

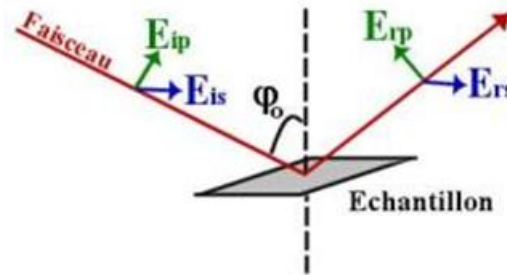


Figure 1.23 : Principe de la mesure par ellipsométrie : une onde monochromatique polarisée est envoyée sur un échantillon et réfléchi. On détecte ensuite les modifications de la polarisation de l'onde réfléchi (composantes normales et tangentes du champ électrique)

Bien que cette technique soit non destructive et offre une large gamme de mesure (ADN¹⁴⁷, protéines¹⁵⁷..), elle reste difficilement intégrable et trop complexe dans son interprétation pour l'appliquer à une détection de type biopuce ou biocapteur. La limite de détection de l'ellipsométrie est de 0,25 ng/mm² pour une protéine telle que la biotine.

Interférométrie : Bien qu'il existe un grand nombre d'interféromètres différents, le principe physique reste le même. D'un point de vue général, il consiste dans l'étude des interférences produites par la combinaison de faisceaux cohérents (provenant d'une même source et vibrant en phase) présentant une différence de marche¹⁴⁹. L'interaction biologique modifie cette différence de marche, et donc les interférences produites. Selon les interféromètres, il est possible d'avoir une détection très sensible, jusqu'à 2 pM pour l'ADN par exemple. L'interférométrie permet une bonne intégration dans les systèmes électroniques et fluidiques. De plus il permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale que l'ellipsométrie.

Spectroscopie Raman exaltée par une surface (SERS) : L'effet Raman est un effet quantique observé lorsque la lumière arrive sur un matériau. Il est basé sur le phénomène de diffusion inélastique des photons^{150, 158}. Les photons qui composent la lumière d'un laser ont tous la même longueur d'onde, mais lorsqu'ils rentrent en collision avec une molécule, ils peuvent

prendre ou céder un peu d'énergie. Cette énergie va être donnée ou absorbée par les phonons, c'est-à-dire les modes de vibrations de la molécule. En analysant la lumière récupérée, nous pouvons acquérir les modes propres de vibration de la molécule. Très schématiquement, cette technique peut être observée sur la figure 1.24. La SERS consiste à générer localement un champ électromagnétique plus important (un point chaud) qui exalte le signal Raman. Les biocapteurs basés sur cette technique comparent les effets Raman des molécules biologiques au niveau des points chauds. La spectroscopie raman peut être utilisée dans la détection d'interactions entre protéine ou de virus¹⁵⁹. La sensibilité de la SERS dans la détection d'un virus est de 100pfu/mL¹⁶⁰ (pfu : plaques forming units : plus petit groupe de virus pathogènes).

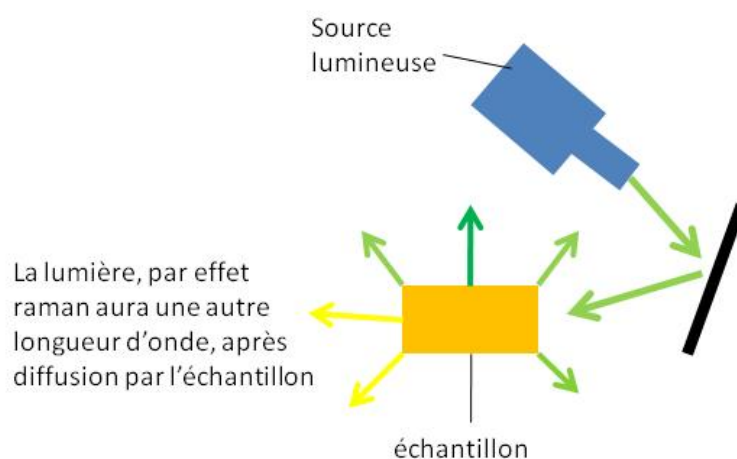


Figure 1.24 : Schéma représentant le principe de la spectroscopie Raman. La majeure partie du faisceau lumineux est transmise dans le matériau, et une mineure partie diffusée. Par analyse de la lumière diffusée, et détection de pics à certaines longueurs d'ondes (distinctes de la longueur d'onde du faisceau incident), on peut déduire la composition chimique de l'échantillon grâce aux modes de vibration spécifiques des molécules.

Les différentes techniques de détection présentées ci-dessus (mécanique /électrochimique /optique), ne sont qu'une petite partie de l'ensemble de ce qui existe. Par souci de concision, et de corrélation avec mon travail de thèse, elles ne seront pas toutes présentées. En particulier, les deux premiers types de détection (mécanique et électrochimique) ne seront plus développés par la suite. Nous allons nous intéresser à la dernière catégorie : la détection optique. De même, dans le cadre de la détection optique, ne seront traitées que certaines techniques, l'ensemble des méthodes étant trop important.

I-4-2 : Présentation détaillée de la détection optique

Comme je l'ai écrit précédemment, il existe deux types de détection optique : avec et sans marquage. Je vais d'abord présenter quelques techniques utilisant le marquage des molécules puis ensuite, les techniques détectant les interactions par voie optique mais sans marquer les molécules. Cette dernière méthode de détection a le principal avantage de ne pas risquer d'endommager ou de modifier de la molécule étudiée.

I-4-2-a : Détection optique avec marquage : la fluorescence

Le marquage biologique consiste à fixer un élément facilement identifiable (fluorescent, magnétique, radioactif, opaque aux rayons X...) sur une biomolécule (monobrs d'ADN, protéines) ou sur une cellule. Les premiers marqueurs proposés étaient radioactifs. Dans la méthode originale de Southern¹⁶¹ une sonde était marquée radioactivement et l'hybridation était détectée par mesure de la radioactivité. Le marquage radioactif reste cependant dangereux et difficile¹⁶² tant pour l'utilisateur que pour l'environnement. Il a été largement remplacé par d'autres types de marquage dont la fluorescence.

La fluorescence a une durée de conservation plus longue que le marquage radioactif et des capacités de multiplexage. Le principe de détection est basé sur l'excitation d'un fluorophore à une longueur d'onde λ_1 donnée et une observation à une longueur d'onde $\lambda_2 > \lambda_1$ (Fig. 1.25).

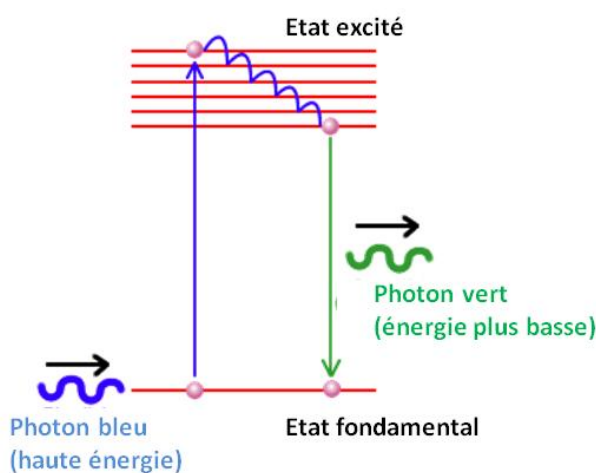


Figure 1.25 : Schéma représentant le principe de la détection par fluorescence : L'électron excité par absorption d'un photon est instable. Afin de retourner dans un état stable, il perd

de l'énergie en émettant un photon ayant une longueur d'onde plus grande (car une énergie plus faible). La lecture du résultat se fera par microscopie ou au moyen d'un scanner.

Le résultat de la détection est interprété à l'aide d'un scanner en fluorescence ou par microscopie. Cette dernière technique est basée sur l'utilisation d'un microscope éclairant l'échantillon à λ_1 (excitation), puis sur l'observation de l'échantillon par l'intermédiaire d'un filtre ne laissant passer que λ_2 . L'utilisation de scanner en fluorescence, répandue dans les plateformes biopuces¹⁰⁹, est basée sur le balayage de l'échantillon par un faisceau très fin de longueur d'onde λ_1 , puis sur l'observation du rayonnement (émis à λ_2) de chaque point sondé de l'échantillon. Une image de la fluorescence peut alors être reconstituée point par point. La figure 1.26 est un exemple d'image en fluorescence d'une biopuce obtenue par scanner en fluorescence.

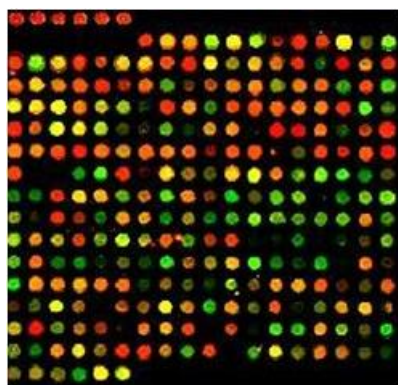


Figure 1.26 : *d'après [109]. Image en fluorescence d'une biopuce obtenue par un scanner*

Il est à noter que les fluorophores classiques ont une durée de vie limitée. Il faut comprendre par là qu'ils ne peuvent recevoir qu'une quantité limitée de photons. Passée cette quantité, la structure chimique du fluorophore va être modifiée entraînant souvent l'extinction de la fluorescence. Ce phénomène est appelé photo-blanchiment ou « bleaching ». Des travaux montrent la possibilité d'inclure les fluorophores dans des nanoparticules afin de diminuer ce phénomène¹⁶³.

Quantum dots¹⁶⁴⁻¹⁶⁵

Dans la fluorescence, il est aussi possible d'inclure les boîtes quantiques ou nanocristaux luminescents, qui sont basés sur le même principe que les fluorophores

« classiques » mais offrant plus de possibilités. En effet, grâce à l'utilisation d'un effet de confinement quantique, il est possible de régler la structure de leur bande d'énergie selon leur taille. Il est ainsi possible d'avoir une émission λ_2 différente selon la taille de la boîte et donc, d'avoir avec une seule excitation, plusieurs résultats d'interactions. La figure 1.27 comprend l'exemple de la structure d'un nano cristal ainsi que le principe d'émission des nanocristaux. 6 nanocristaux différents (de cœur (CdSe) ayant des tailles différentes) émettront à 6 longueurs d'onde distinctes, en étant excités à une seule et même longueur d'onde. Il est possible de fixer sur 6 molécules différentes ces nanocristaux, les exciter puis observer par fluorescence les réponses. Avec une seule expérience, on aura donc la possibilité d'avoir 6 résultats différents, c'est ce qu'on appelle un multiplexage. Un autre de leurs avantages est la stabilité de l'émission des nanocristaux dans le temps. Il n'y a en effet pas le problème de blanchiment comme on peut le trouver dans des fluorophores « classiques ».

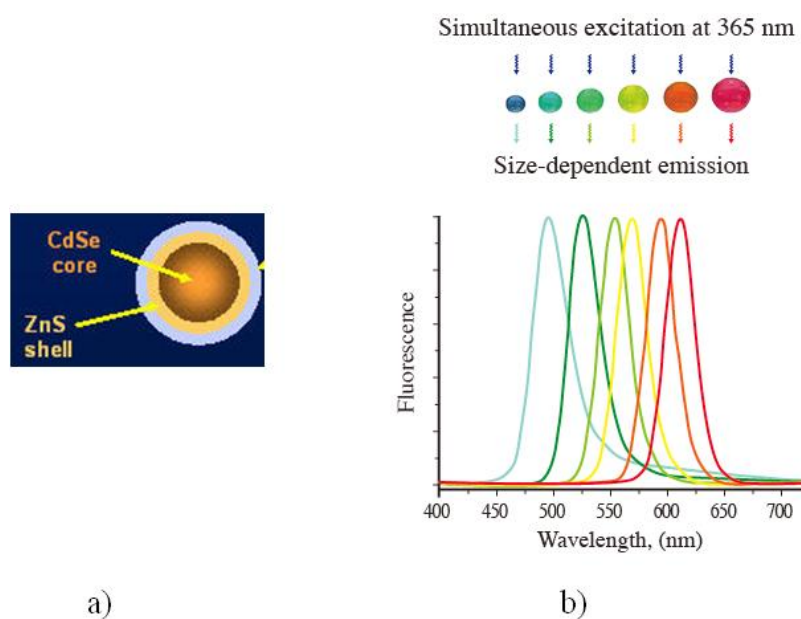


Figure 1.27 : D'après [166]. a) Principe des nanocristaux. b) Exemple de la fluorescence de 6 nanos cristaux différents (de diamètre différent) excités à une seule et même longueur d'onde.

La fluorescence est, de nos jours, utilisée dans différents domaines (hybridation de l'ADN, tests immunologiques, criblage pharmaceutique). Sa limite de détection est de l'ordre du picomolaire pour l'ADN (fluorophores « classiques »). Bien que l'utilisation de boîtes quantiques permet de garder une stabilité de l'émission, il y a toujours un risque de

perturber la cinétique de réaction ou de modifier la molécule elle-même lors de la fixation du fluorophore ou de la boîte quantique. De même les analyses réalisées avec des molécules marquées ne peuvent pas être contrôlées avec précision, au niveau quantitatif, à cause du nombre inconnu de fluorophores accrochés sur chaque molécule¹⁶⁷. A l’opposé, la détection sans marquage n’a pas besoin de fixer un fluorophore ou une boîte quantique sur la molécule, il y a donc moins de risque d’altérer les fonctions de la molécule. Ce type de détection, relativement simple, permet une étude quantitative des biomolécules étudiées. Quelques exemples de détection optique sans marquage ont rapidement été donnés dans le 1-4-1-c. Nous allons à présent voir en détails deux autres types de détection optique sans marquage commercialisés : la Résonance de plasmons de surface (SPR)¹⁶⁸⁻¹⁷¹ et la diffraction¹⁷²⁻¹⁷³.

I-4-2-b : Détection optique sans marquage

Une illustration schématique de la détection optique sans marquage peut être observée sur la figure 1.28.

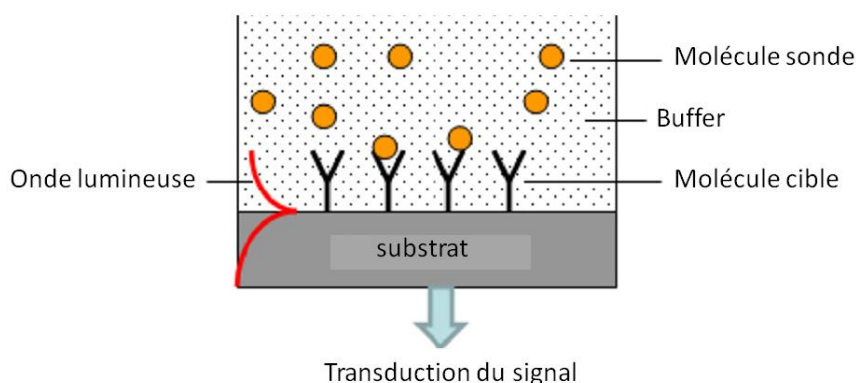


Figure 1.28 : *Illustration conceptuelle d’une biopuce à détection optique sans marquage*

Le but est de réussir à détecter l’interaction en étudiant la variation des propriétés optiques à la surface de la puce. Lors de l’interaction entre les molécules cibles et les molécules sondes, l’onde lumineuse va être modifiée engendrant une variation, en général, de son intensité. Cette variation sera traduite par le transducteur utilisé (différent selon la méthode choisie). Dans la suite de cette partie, nous allons voir deux techniques différentes de détection sans marquage: la Résonance plasmonique de surface (SPR) et la diffraction.

I-4-2-b-1 : Résonance de plasmons de surface : SPR¹⁷⁴⁻¹⁸⁰

La physique de la résonance plasmonique a longuement été étudiée, spécialement depuis la fin des années 60¹⁷¹. Cependant c'est depuis la démonstration par Nylander et Liedberg en 1982¹⁷⁴⁻¹⁷⁵ de détection de gaz et de biomolécules par SPR que cette méthode n'a cessé de connaître un intérêt grandissant. Depuis, cette technique a été améliorée pour devenir un outil très puissant dans l'étude de l'interaction entre une cible et une molécule sonde¹⁷⁵⁻¹⁸⁰. La SPR est basée sur le principe de la résonance des plasmons de surface. Cette résonance est la résultante de l'excitation collective d'une densité de charges qui peut exister à l'interface de deux milieux de constantes diélectriques de signes opposés (métal/diélectrique par exemple), engendrée par une onde lumineuse. L'oscillation collective (ou onde de densité de charges) coexiste avec le champ électromagnétique évanescent des deux côtés de l'interface.

La résonance plasmonique de surface n'est possible que dans le cas de la réflexion totale de l'onde lumineuse incidente. En effet, d'après la loi de Descartes, il existe un angle critique θ au-delà duquel la lumière incidente est totalement réfléchi. L'association du phénomène de réflexion totale avec des milieux de constantes diélectriques différentes provoque la création d'une onde évanescente, dont la longueur d'onde est égale à celle de la lumière incidente. La pénétration de l'onde évanescente dans le milieu conducteur entraîne la génération d'ondes électromagnétiques, basées sur la génération de plasmons de surface, sur la face opposée du métal. Cette onde électromagnétique se propage selon un vecteur d'onde (k_{sp} sur la figure 1.29) dépendant de l'indice de réfraction du milieu et des propriétés de l'onde évanescente (Fig. 1.29). La composante du vecteur d'onde (k_x) issu des photons de la lumière incidente est caractérisé par la longueur d'onde et l'angle d'incidence de la lumière incidente. L'égalité des deux vecteurs d'ondes (condition de résonance) provoque la génération de plasmons de surface, et donc provoque un transfert résonant d'énergie. La SPR se manifeste par l'absorption résonante de l'énergie de l'onde incidente et donc par une onde lumineuse réfléchi nettement atténuée (dite sombre). Lors de l'interaction biologique, l'environnement moléculaire à la surface va varier. Cette variation entraîne un changement dans l'indice de réfraction et modifie la condition de résonance. Comme les deux vecteurs sont égaux (k_{sp} et k_x) et qu'ils conservent leur égalité (phénomène SPR), la variation de l'un va entraîner la variation de l'autre. La longueur d'onde de l'onde lumineuse incidente étant fixe, c'est l'angle de la résonance θ qui va varier. L'angle de l'onde réfléchi variant avec θ ,

la mesure de la variation de l'onde réfléchie sera alors une indication de l'écartement à la résonance et donc de la quantité d'évènements d'absorption à la surface du prisme.

Ainsi, sans marquage, il est possible de mesurer quantitativement les interactions entre les sondes et les cibles.

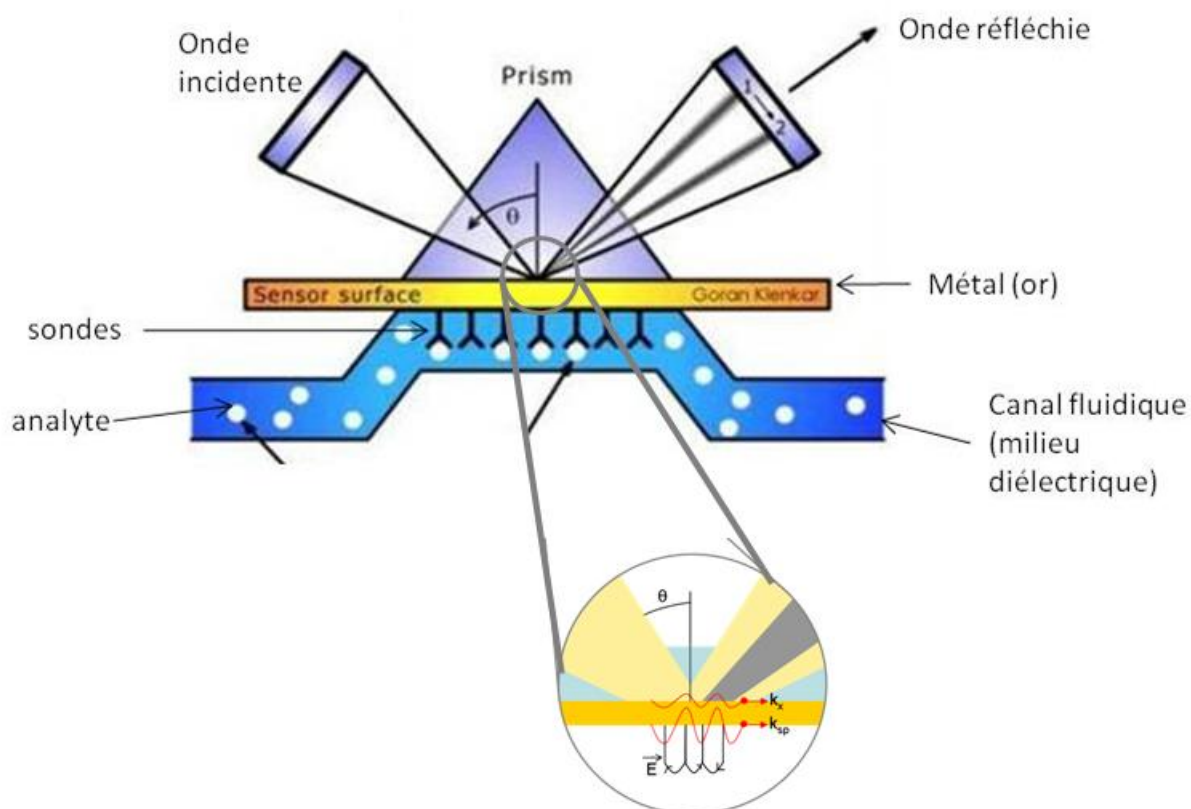


Figure 1.29 : Principe de la résonance plasmonique de surface. Le champ électromagnétique dans le milieu biologique présentant un caractère d'onde évanescente, la fixation de molécules sur l'interface va modifier l'indice de réfraction du milieu, modifiant ainsi l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude. Cette modification va entraîner une variation de la résonance. Par la mesure des variations d'intensité de l'onde réfléchie, on obtient un signal caractéristique de l'interaction des molécules.

On pourra détecter diverses interactions telles que : substrat-enzyme¹⁸¹, anticorps/antigène¹⁸¹, protéine/cellule¹⁸², à des sensibilités très élevées : une variation de 1 millidegré de l'onde réfléchie correspond à une variation de masse de 1 pg/mm². En

plus de la reconnaissance biologique, cette méthode de transduction permet la recherche d'informations quantitatives sur la reconnaissance : identification d'une molécule, spécificité de l'interaction etc. De plus, l'incubation des molécules dans le dispositif microfluidique permet de suivre en temps réel l'évolution de l'interaction. Ce système permet donc d'avoir la mesure de cinétique d'adsorption en temps réel. Le succès de la SPR est largement porté par la réussite de la société Biacore AB¹⁸³ récemment racheté par General Electrics.

Il est à noter qu'il y a différentes variations autour de la SPR, au niveau du système de couplage de l'onde incidente avec les plasmons. Le système présenté ici utilise un prisme¹⁸⁴, mais il est possible d'utiliser un guide d'onde¹⁸⁵ ou une fibre optique¹⁸⁶.

Nous allons à présent voir une autre technique de détection quantitative des interactions entre molécules sans marquage : la diffraction.

I-4-2-b-2 : Diffraction

La détection par diffraction est basée sur le principe de la diffraction de la lumière par une structure périodique. Un réseau à une dimension transforme une onde plane monochromatique incidente en une onde réfléchie (suivant les lois de Descartes : $\theta_i = \theta_r$) et en des faisceaux diffractés suivant des ordres définis par des angles d'émergence différents (Fig. 1.30). L'amplitude de ces ordres de diffraction étant définie par les dimensions du réseau (hauteur h , largeur l , période p), tout changement dans ses paramètres entrainera une modification dans sa réponse lumineuse. Le changement peut être amené, par exemple, par élargissement ou grossissement des lignes lors de l'adsorption de molécules cibles sur les lignes du réseau. C'est cette variation qui est alors mesurée afin de détecter les événements d'adsorption moléculaire à la surface du réseau.

Plusieurs équipes différentes ont travaillé sur la diffraction. Dès 1991, Tsay et al.¹⁷² démontrent la possibilité d'utiliser la diffraction pour la biodétection en transformant une couche homogène d'anticorps (AC) actifs en lignes d'AC actifs et inactifs par illumination (UV) à travers un masque. Un capteur placé sur l'ordre 1 de la diffraction mesure l'intensité du faisceau diffracté avant et après immobilisation de l'antigène. Lorsque le réseau d'antigène se forme, les auteurs observent une variation du signal de diffraction.

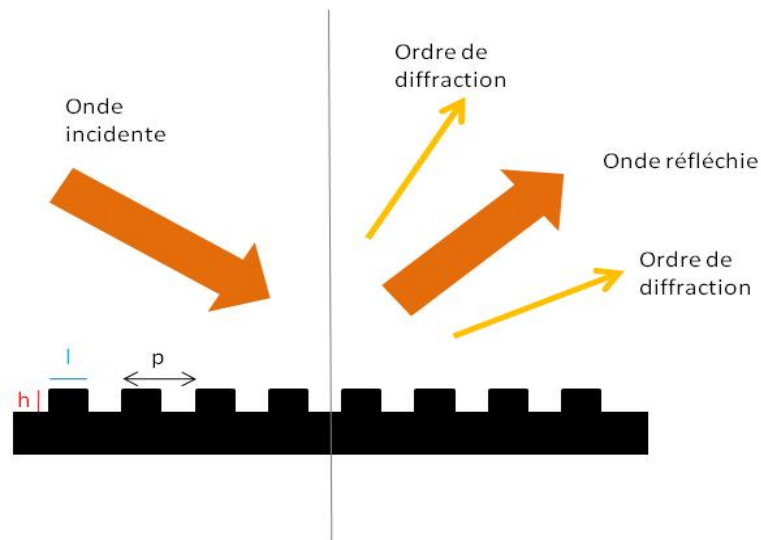


Figure 1.30 : *Principe de la diffraction par un réseau*

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'améliorer la détection par diffraction dans le but de la commercialiser. En particulier, le système de fabrication des réseaux de lignes a été revu pour remplacer la photolithographie par le micro contact printing¹⁷³. C'est en 2003, que Goh et al. démontrent la possibilité de suivre en temps réel l'interaction d'anticorps sur des sondes composant un réseau avec des concentrations de l'ordre de $2.5 \mu\text{g/mL}$ ¹⁸⁷⁻¹⁸⁸. Un réseau de biomolécules est déposé par μCP sur la face inférieure d'une lame de verre qui délimite une cellule microfluidique. L'éclairement du réseau et la détection du spectre de diffraction sont réalisés à l'aide d'un prisme qui permet une meilleure collection du signal (Fig. 1.31)

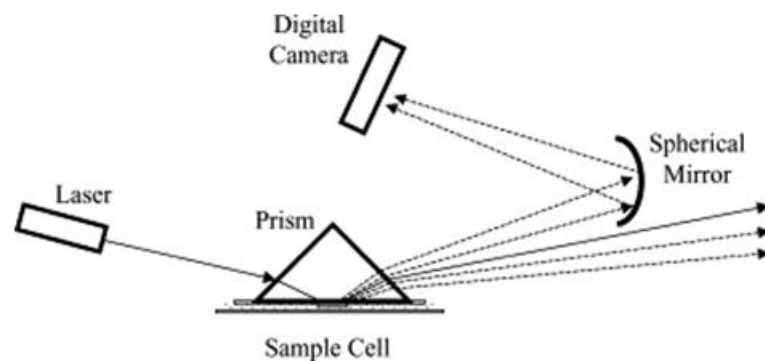


Figure 1.31 : *d'après [187]. Schéma du dispositif utilisé par Goh et al. Pour mesurer la diffraction d'un réseau biomoléculaire et détecter ainsi des interactions spécifiques cibles-sondes.*

Une amélioration de ce procédé, faite par cette même équipe, consiste à superposer deux réseaux l'un sur l'autre, en les croisant. Les figures de diffraction de chacun des réseaux étant perpendiculaire l'une par rapport à l'autre, il est possible de quantifier la diffraction de chaque réseau et ainsi de détecter deux types d'interaction en une seule et même étape.

Ces systèmes ont été commercialisés par Axela biosensors¹⁸⁹.

Il existe donc de nombreux types de détection différentes avec et sans marquage, certaines étant déjà commercialisées. Chacune de ces techniques a à la fois des défauts et des avantages, plus ou moins conséquents. Le tableau ci-dessous est un résumé de cette partie du chapitre I. Afin de simplifier au maximum, ne figure dans le tableau que les points que nous considérons comme « majeurs » dans le choix de la technique de détection :

- Marquage
- Limite de détection
- La technique commercialisée ou en développement
- Densité des tests (faible/moyen/élevé : par comparaison entre elles)
- Coût (faible/moyen/élevé : par comparaison entre elles)

Selon les méthodes, les molécules détectées ne sont pas toujours les mêmes. La nature de la molécule sera précisée, ainsi que son unité de mesure en moles ou en grammes (biomolécules), ou en plaques forming units (pfu) pour les virus. Les quantités sont normalisées par rapport au volume de la solution dans laquelle elle se trouve, ou par rapport à la surface du dispositif utilisé.

<i>Technique de détection</i>	<i>Marquage</i>	<i>Limite de détection</i>	<i>Etat de la technique</i>	<i>Densités des tests réalisés</i>	<i>Le coût</i>
Microbalance à quartz	Non	Anticorps : 1 µg/mL	Commercialisée	Faible	-
Potentiométrie	Non	Proteines : 10 pM		Faible	Faible

Conductimétrie	Non	Herbicide : 5nM		Faible	Faible
Quantum dots	Oui	De l'ordre du nM	Rare ou En développement		Moyen
Fluorophores	Oui	ADN : pM	Commercialisée	Très élevée	Moyen
Ellipsométrie	Non	Protéine : 0.25 ng/mm ²	Rare	Faible	-
Interférométrie	Non	ADN : 2 pM	Commercialisée	moyenne	Elevé
Résonance des plasmons de surface	Non	ADN : 10 pM	Commercialisée	moyenne	Elevé
Spectroscopie Raman	Non	Virus : 100 pfu/mL	Commercialisée	moyenne	
Diffraction	Non	Anticorps : 2.5 µg/mL	Commercialisée (temps réel)		

Tableau 1 : *d'après [151, 160,188,190,191]. Récapitulatif des différentes techniques de détection d'interaction.*

Ces travaux de thèse se sont concentrés sur la détection optique sans marquage et plus particulièrement sur la diffraction. Comme nous le verrons plus loin (chapitre III), le système choisi est encore différent de celui développé par Goh et al. Nous avons cherché à réduire au

maximum le coût de la détection et à simplifier le plus possible le système afin de déboucher sur un prototype de produit commercial compétitif.

A travers ce premier chapitre, nous avons pu voir les différents aspects de l'étude d'interactions entre deux molécules. Que se soit de la fabrication de la biopuce, à la détection d'interactions en passant par l'intérêt des biopuces ou du criblage et aussi l'importance et la nécessité d'améliorer constamment ce qui peut déjà exister. Nous allons à présent, dans cette dernière partie d'introduction, resituer le contexte dans lequel ce travail de thèse est « né ». Pourquoi ? Grâce à qui ? Dans quel intérêt ? Avec quelle collaboration ? Je vais essayer de répondre à ces questions afin que vous puissiez comprendre l'intérêt, tout d'abord de ce que vous avez lu et de ce que vous allez lire, mais aussi le but final de ces 3 ans de thèse .

I-5 : Conclusion et mise en place du problème

Au-delà de l'intérêt scientifique d'améliorer sans cesse et de pousser plus loin nos compétences et notre savoir faire, cette thèse est née de la collaboration de 4 partenaires. Collaborateurs industriels ou académiques, chacun à amener ses connaissances afin de tout d'abord créer et définir le projet, et ensuite le développer et le porter à son terme. Les intérêts finaux de chacun étaient différents (industrie, académie) mais la réunion des 4 savoir-faire permit à ce projet d'être concrétisé.

I-5-1 : Contexte de la thèse

Comme nous l'avons vu, le criblage pharmacologique à haut débit est une technologie automatisée de recherche de candidats médicaments utilisée depuis le début des années 90 dans les différentes entreprises pharmaceutiques. L'automatisation, due aux facilités de standardisation, s'est développée autour des formats des micros puits très utilisés par les biologistes. Bien que le format des micros plaques soit passé de 96 à 1536 puits, l'industrie pharmaceutique n'est pas sortie des contraintes initiales fixées.

Afin de s'affranchir d'un certain nombre de ces obligations, une nouvelle manière de criblée à été pensée. En effet, au delà de la miniaturisation demandée, nous avons voulu nous affranchir du marquage des réactifs, ainsi que des robots et des puits. Au final, c'est le

principe des biopuces sur lame, couramment utilisé par les plateformes génomiques qui a été adapté et amélioré afin de satisfaire au protocole de criblage pharmaceutique conventionnel mais aussi dans le but de développer une alternative aux scanners en fluorescence, principal moyen de détection utilisé pour les biopuces à l'heure actuelle. Au-delà de l'augmentation de la densité des tests, ce projet représente une réelle rupture technologique avec les systèmes existants : pas de marquage, système de lecture simplifié, rapidité, nouvelle technique de structuration du matériel biologique sur la lame de verre.

I-5-2 : Couplage industriel

Ce projet a donc vu le jour grâce au partenariat de 4 entités différentes : la plateforme biopuce du génopôle de Toulouse (PGBT) à l'INSA, la société Innopsys, L'unité mixte de service CNRS/Pierre Fabre 2646 (UMS 2646) et le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS). Chaque partenaire, comme dit précédemment, a amené avec lui dans ce projet son savoir faire :

La PGBT possède les équipements de base (robot de dépôt, scanner en fluorescence), ainsi que l'expertise de greffage chimique des biomolécules sur support de verre ou de silicium.

La société Innopsys, développeur et fabricant d'instrumentation optoélectronique, possède une large expertise et une expérience dans le développement de scanners en fluorescence.

L'unité mixte CNRS/Pierre Fabre a mis en œuvre depuis 1999 une activité de miniaturisation des essais biologiques et de criblage pharmacologique automatisé à haut débit.

Le LAAS est porteur des technologies de détection d'interaction moléculaire par diffraction issues du développement des techniques de structuration des surfaces à l'échelle nanométrique par lithographie douce.

Un automate d'impression moléculaire, pour le dépôt de molécules par μ CP à grande échelle a du être développé en collaboration entre la PBGT et le LAAS. Le LAAS s'est occupé du développement des moules silicium par lithographie avancée tandis que l'unité mixte a mis au point un processus de criblage sur support solide. Innopsys a participé à l'élaboration avec le LAAS du format de la biopuce ainsi que de l'optimisation du couple biopuce/scanner en termes de coût et performance. Après montage du banc de diffraction au LAAS, Innopsys a aussi du développer la maquette d'un scanner optique permettant la lecture par diffraction de la biopuce.

Ce projet s'inscrit donc dans une stratégie de collaboration interdisciplinaire à long terme appliquée aux sciences du vivant, incluant une démarche de transfert industriel qui s'est concrétisée par le dépôt de deux brevets internationaux.

I-5-3 : Travail de fond (simulation de la diffraction)

La première chose qui a été faite dans ce projet a été la simulation de la diffraction par des réseaux de molécules. Le principe de diffraction était certes connu, mais la simulation a permis de dégager des tendances permettant d'optimiser la taille des motifs (pas du réseau, largeur des lignes, taille du réseau...) afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible. Comme les supports de nos biopuces pouvaient être soit en verre soit en silicium, il a fallu placer la diffraction dans le cas d'un réseau en réflexion (la transmission n'étant pas possible à travers le silicium). Jean-Christophe CAU, doctorant au LAAS, a fait tout le travail de fond sur la diffraction, travail consigné dans son mémoire de thèse¹⁹². Il est sorti de ses simulations une première ébauche du travail que nous devons faire.

Afin de s'affranchir de la fluctuation du laser, la mesure finale de la variation de l'intensité lumineuse est dépendante de la puissance reçue par le photodétecteur à l'ordre 1 mais aussi de celle reçue par le photodétecteur incident (Fig. 1.32). La mesure finale, aussi appelée gain du signal (gain G) est le paramètre qui va détecter l'interaction spécifique ou non spécifique, en comparant le signal de diffraction après interaction au signal initial.

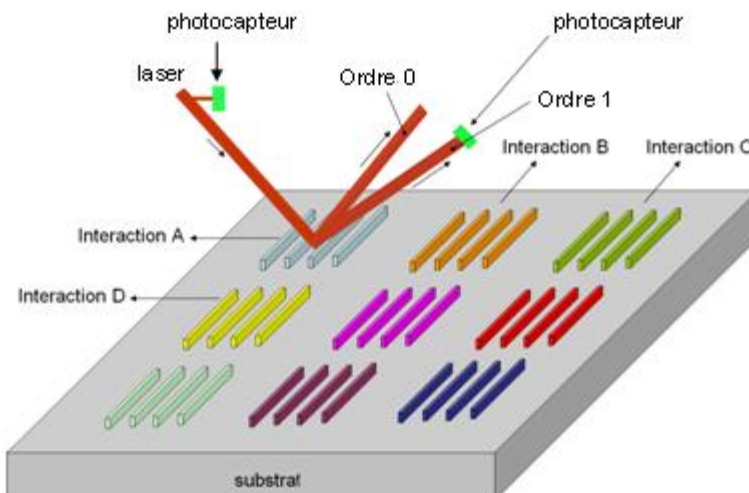


Figure 1.32 : D'après [192]. Représentation schématique de la biopuce.

La taille optimale des réseaux, que ce soit leur largeur, leur pas mais aussi leur hauteur (nombre de couches des molécules) a été dégagée. Nous avons donc travaillé avec des réseaux de pas micrométrique (1 μ m) afin de pouvoir séparer l'ordre 1 des autres ordres de diffraction. En effet les figures de diffraction obéissent à la loi suivante :

$$\sin \theta_m - \sin \theta_i = m\lambda/d$$

où d est la période du réseau, λ la longueur d'onde du laser utilisé, m l'ordre de diffraction et θ_i et θ_m respectivement, l'angle de la lumière incidente et l'angle de la lumière diffractée d'ordre m (en degrés). Le faisceau arrivant avec une incidence normale sur notre substrat, l'équation se simplifie en :

$$\sin \theta_m = m\lambda/d$$

Le laser Hélium-Néon (He-Ne) que nous avons pris a pour longueur d'onde $\lambda=633$ nm. Dans ces conditions, afin de pouvoir mesurer l'ordre 1 de la diffraction sans interférence avec d'autres ordres, le pas devait être faible. Nous l'avons choisis de l'ordre de 1 μ m, ce qui nous a permis de pouvoir mesurer l'ordre 1 de diffraction ($\theta_{m=1} = 40^\circ$ dans cette configuration) sans avoir d'interférence avec les autres ordres. En effet, un pas trop grand (par exemple un pas de 5 μ m¹⁹³), entraînerait des ordres de diffraction confondus difficile à découpler sur des distances commensurables avec les dimensions d'un scanner.

Les simulations ont aussi prouvé que la largeur des lignes devaient être égale à la moitié du pas afin d'obtenir des signaux associés au pic de diffraction de l'ordre 1 de forte intensité

(chapitre III). Il a aussi été calculé la nécessité d'avoir ou pas une chimie de surface d'épaisseur importante selon l'indice des molécules servant de sonde. En effet, un compromis entre une puissance diffractée importante (chimie de surface épaisse) et un gain du signal maximal lors de la détection (chimie de surface très fine) a du être trouvé. Au sortir de ces résultats, une chimie de surface a été étudiée pour chacune des molécules choisies. Cette partie sera développée au chapitre II (II-3). Pour finir, le système de diffraction élaboré permet d'avoir 4 états « bio-logiques » pour 3 résultats différents. En effet, dans les biopuces conventionnelles, il n'existe que deux états de réponse : l'interaction a eu lieu (état 1) ou non (état 0) avec les molécules sondes. Il est nécessaire de réaliser une deuxième expérience dite « tests négatifs » afin de vérifier la spécificité de cette interaction. Ces deuxièmes tests sont en général réalisés sans les molécules sondes. Dans le cas des biopuces classiques, deux expériences sont donc à effectuer alors que la biopuce « diffractante » permet, en une seule mesure, de différencier les interactions non spécifiques, des interactions spécifiques (Fig. 1.33)

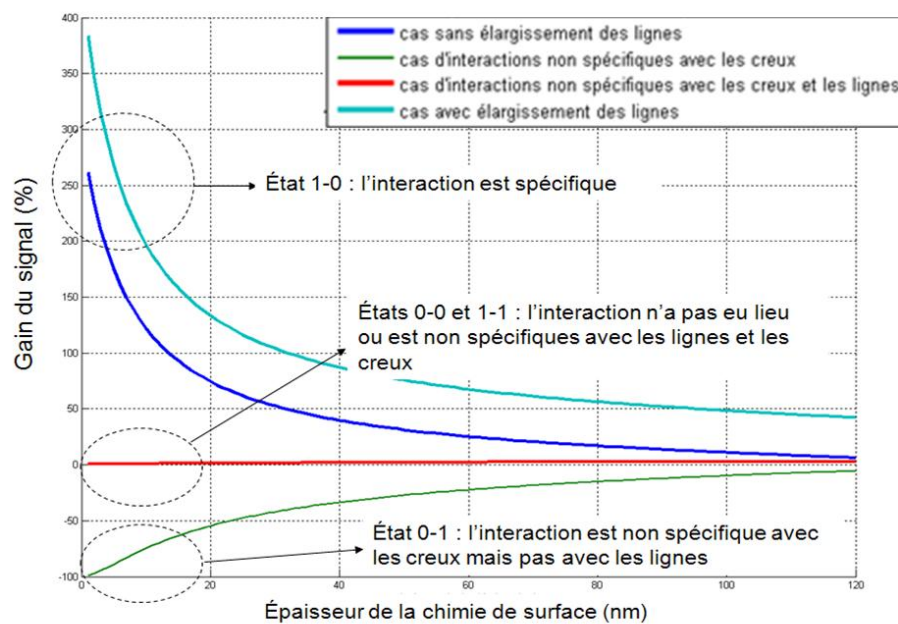


Figure 1.33 : d'après [192]. Gain G (paramètre qui détecte l'interaction spécifique et qui compare le signal de diffraction après interaction au signal initial) du signal émis par la biopuce en fonction de l'épaisseur de chimie de surface. 3 états d'interaction peuvent être mis en évidence.

Les travaux préalables de Jean-Christophe Cau ont donc permis, outre l'obtention des conditions optimales pour le réseau, d'avoir une technologie capable de détecter aussi bien

une interaction non spécifique (interaction des molécules cibles avec les creux du réseau : $G < 0$), qu'une interaction spécifique (interaction des molécules cibles avec les lignes du réseau : $G > 0$). Le cas où $G = 0$ ne permet pas de conclure à une solution particulière, tant pour la non spécificité que pour l'absence d'interactions spécifiques entre la cible et la sonde. Il est à noter que dans les cas présentés, les molécules cibles peuvent être ou ne pas être complémentaires avec les molécules sondes.

I-5-4 : Enjeux biopuce et criblage

Au vu de la nécessité de toujours réduire le coût des systèmes, d'accroître leur rendement et leur rapidité, des améliorations sont constamment à apporter. La collaboration entre les deux partenaires industriels et les deux partenaires académiques a permis d'avancer dans le domaine des biopuces et du criblage. L'avancement a eu lieu à plusieurs niveaux : amélioration du rendement, diminution du coût, augmentation de la fiabilité des résultats. Certaines choses ont donc été améliorées, mais d'autres ont été entièrement conçues, comme le « macrotimbre » (II-2-3). Nous sommes partis des connaissances existantes dans chacun des domaines, puis nous les avons améliorées, transformées, adaptées pour obtenir

un nouveau moyen de déposer plusieurs molécules différentes en une seule étape par lithographie douce (II-2-3),

une biopuce « diffractante » plus performante car permettant d'obtenir des résultats mieux définis,

une nouvelle méthodologie de criblage pharmacologique,

une nouvelle technologie permettant la réalisation d'une plateforme biopuce bas coût.

Durant la suite de ce manuscrit, nous verrons toutes les améliorations, tous les changements, les développements que nous avons effectués afin d'arriver au but final de ce projet : le développement d'une station de criblage miniaturisée et un nouvel outil de détection d'interactions tant pour le criblage que pour la lecture des biopuces à ADN ou à protéines.

Tout d'abord, nous verrons la manière que nous avons choisie d'employer pour structurer les biopuces ainsi que les différentes chimies de surface, adaptée aux molécules étudiées (chapitre II). Nous verrons ensuite la diffraction : moyen de détection à faible coût et

à grande fiabilité (chapitre III). Puis enfin, une ouverture possible sur des améliorations susceptibles d'être développées par la suite (chapitre IV). Il est à noter que les expériences liées au criblage ne seront que peu détaillées, en particulier dans le chapitre III (diffraction), où nous nous focaliserons sur la détection de l'hybridation de deux brins d'ADN parfaitement complémentaires.

Références

- 1: optical lithography, *a special issue of IBM J. Res. Dev.* 1997, 3, 1.
- 2: T. Ito, S. Okazaki *Nature* 2000, 406, 1027.
- 3: A.K. Bates, M. Rothschild *IBM J. Res. Dev.* 2001, 45, 605.
- 4: C.A. Mirkin, J.A. Rogers *MRS Bull.* 2001
- 5: C. Vieu, F. Carcenac, A. Pépin, Y. Chen, H. Launois *Appl. Surf. Sci.* 2000, 164, 111.
- 6: Y. Xia, J.A. Rogers, K.E. Paul, G.M. Whitesides *Chem. Rev.* 1999, 99, 1823
- 7: Y. Xia, G.M. Whitesides *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1998, 37, 550
- 8: Y. Xia, G.M. Whitesides *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, 28, 153
- 9: B. D. Gates, G. Xu, M. Steawart, G. M. Whitesides *Chem. Rev.* 2005, 105, 1171-1196.
- 10: A Kumar, H.A. Biebuyck, G.M. Whitesides *Langmuir* 1994, 10, 1498
- 11: Y. Xia, G.M. Whitesides *Langmuir* 1997, 13, 2059
- 12: R.S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D.E. Ingber, G.M. Whitesides *biomaterials* 1999, 20, 2363
- 13: J.L. Tan, J. Tien *Langmuir* 2002, 18, 519
- 14: A. Bernard, E. Delamarche *Langmuir* 1998, 14, 2225
- 15: A. Fang, H. Ng *Langmuir* 2000, 16, 5221
- 16: L. Xu, L. Robert, Q. Ouyang *nanoleters* 2007, 7, 2068
- 17: C. Thibault, C. Severac *Microelectronic Engineering* 2006, 83, 1513
- 18: N. Tomczak, G.J. Vancso *European Polymer Journal* 2007, 43, 1595
- 19: C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François, C. Vieu *J. Nanobiotech* 2005, 3:7.
- 20: Y. Xia, M. Mrksich, E. Kim, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 9576
- 21: St. John, P. M.; Craighead, H. G. *Appl. Phys. Lett.* 1996, 68, 1022
- 22: B. D. Gates, G. M. Whitesides *J. AM. Chem. Soc.* 2003, 125, 14986
- 23: X. M. Zhao, Y. Xia, G. M. Whitesides *Adv. Matter.* 1996, 8, 837
- 24: C.D. James, R.C. Davis, L. Kam *Langmuir* 1998, 14, 741
- 25: B. Michel, A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche *IBM Journal of Research and Development* 2001, 45, 5.
- 26: J. P. Renault, A. Bernard, A. Bietsch, B. Michel *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 703.
- 27: J. L. Wilbur, A. Kumar, E. Kim, G. M. Whitesides *Adv. Matter.* 1994, 6, 600.
- 28: D. Burdinski, M. Saalmink *angewandte chemie Int. Ed.* 2006, 45, 4355-4358.
- 29: H. Li, D. J. Kang, M.G. Blamire, W.T.S. Huck *Nanoleters* 2002, 2, 347.

- 30: H. H. Lee, E. Menard, J. Tassi, J. Rogers, G. Blanchet *Materials Research Society* 2005, 846, 731-736.
- 31: H. Lalo, J. C. Cau, C. Thibault, N. Marsaud *Microelec. Eng. Special issue MNE* 2008.
- 32: E. L. Kyser, L. F. Collins, N. Herbert *J. Appl. Photographic Engi.* 1981, 7, 73-79.
- 33: A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood *Biosensors and Bioelectronics* 1996, 11, 687
- 34: www.gesim.de
- 35: R. H. Timothy *Nature Biotech.* 2001, 19, 342.
- 36: www.agilent.com
- 37: W. Voit, W. Zapka, L. Belova, K. V. Rao *Proc. Inst. Elect. Eng. Sci. Measure. Technol.* 2003, 150, 252.
- 38: <http://www.incyte.com/>
- 39: J. M., Jaklevic, H. R., Garner, G. A., Miller *Annual Reviews in Biomedical Engineering* 1999, 1, 649.
- 40: P. Belaubre, M. Guirardel, V. Leberre, J.-B. Pourciel, C. Bergaud, *Sens. and Act. A* 2004, 110, 130.
- 41: T. Leïchl , D. Saya, J.-B. Pourciel, F. Mathieu, C. Bergaud, et L. Nicu, *IEEE NTC Review on Advances in Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* 2006, 1, 337.
- 42: J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt *Analytica Chimica Acta* 2002, 469, 3.
- 43: R. A. George, J. P. Woolley, P. T. Spellman *Genome Res.* 2001, 11, 1780.
- 44: M. O. Reese, R. M. van Dam, A. Scherer, S. R. Quake *Genome Res.* 2003, 13, 2348.

I-2: Présentation biopuce/biocapteur

- 45: D. J. Lockhart, E. A. Winzeler *Nature* 2000, 405, 827.
- 46: D. S. Wilson, S Nock *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 494.
- 47: *Microsystem Engineering of lab-on-chip Devices*, Wiley-VCH 2004
- 48: V. Espina, A. I. Mehta, M. E. Winters, V. Calvert, J. Wulfschle, E. F. Petricoin, L. A. Liotta *Proteomics* 2003, 3, 2091.
- 49: M. C. Pirrung *Ang. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 1276.
- 50: M. Lynch, C. Mosher, J. Huff, S. Nettikadan, J. Johnson, E. Henderson *Proteomics* 2004, 4, 1695.
- 51: T. M. Gress, *Mamm. Genome* 1992, 3, 609.
- 52: C. Friemert, V. Erfle, G. Strauss *Methods Mol. Cell Biol.* 1989, 1, 143.
- 53: J. D. Watson, F. H. C. Crick *Nature* 1953, 171, 964.

- 54: J. Lamartine *Mater. Sci. Eng.* 2006, 26, 354.
- 55: F. Bertucci, R. Houlgatte, C. Nguyen *Lancet. Oncol.* 2001, 2, 674.
- 56: P.A. Bryant, D. Venter, N. Curtis *Lancet. Infect. Dis.* 2004, 4, 100.
- 57: C. Xiang, Y. Chen *Biotechnol. Adv.* 2000, 18, 35.
- 58: D. E. Bassett, M.B. Eisen, M. S. Boguski *Nat. Genet.* 1999, 21, 51.
- 59: J. Marx *Science* 2000, 289, 1670.
- 60: E. F. Nuwaysir, M. Bittner, J. Trent, J.C. Barrett, C.A. Afshari *Mol. Carcinog.* 1999, 24, 153.
- 61: N. Sergeev, M. Distler, S. Courtney, S.F. Al-Khaldi, D. Volokhov, V. Chizhikov, A. Rasooly *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 684.
- 62: G. MacBeath, S. L. Schreiber *Science* 2000, 289, 1760.
- 63: H. Zhu, M. Snyder *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 40.
- 64: H. Zhu, M. Snyder *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7, 55.
- 65: P. E. Buckle, R. J. Davies, T. Kinning, D. Yeung *Biosens. Bioelectron.* 1993, 8, 355.
- 66: H. J. Watts, D. V. Pollard-Knight, C. R. Lowe *Anal. Chem.* 1994, 66, 2465.
- 67: C. Huels, S. Muellner, E. M. Meyer, D. J. Cahill *Drug Discov Today* 2002, 7, 119.
- 68: W. Norde, J. Lykleman *J. Colloid Interface Sci.* 1979, 71, 350.
- 69: K. L. Prime, G. M. Whitesides *Science* 1991, 252, 1164.
- 70: K. L. Prime, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 10714.
- 71: E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu *Langmuir* 1996, 12, 1997.
- 72: <http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/>
- 73: B. Lu, M. R. Smyth, R. O'Kennedy *The Analyst* 1996, 121, 29.
- 74: A. Lueking, M. Horn, H. Eickoff, K. Bssow, H. Lehrach, G. Walter *Anal Biochem* 1999, 270, 103.
- 75: R. A. Vijayendran, D. E. Leckband *Anal Chem* 2001, 73, 471.
- 76: E. F. Petricoin, A. M. Ardekani, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, L. A. Liotta, *Lancet* 2002, 359, 572.
- 77: W. H. Robinson, C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese *Nat. Med.* 2002, 8, 295.
- 78: M. Dufva *Biomol. Eng.* 2005, 22, 173.
- 79: A. M. Castellino *Genome Res.* 1997, 7, 943.
- 80: M. Campas, I. Katakis *Trends Anal. Chem.* 2004, 23, 49.
- 81: E. M. Southern, U. Maskos, J. K. Elder *Genomics* 1992, 13, 1008.

- 82: S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung *Science* 1991, 251, 767.
- 83: S. M. Miller, D. M. Tourlousse, R. D. Stedtfeld, S. W. Baushke, A. B. Herzog *American Society for Microbiology* 2008, 74, 2200.
- 84 : M. G. Carter, T. Hamatani, A. A. Sharov, C. E. Carmack, Y. Qian, K. Aiba, N. T. Ko *Genome Res.* 2003, 13, 1011.
- 85: S. P. A., Fodor *Science* 1997, 277, 393.
- 86: M. Chee *Science* 1996, 274, 610.
- 87: M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad *Tibtech* 1998, 16, 301.
- 88: K. C. Chan, T. Kim, J. K. Shoer, R. M. Crooks *J. Am. Chem.Soc.* 1995, 117, 5875.
- 89: D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper *Angew. Chem. Int. Ed.Engl.* 1995, 34, 91.
- 90: S. A. Sundberg, R. W. Barrett, M. Pirrung, A. L. Lu *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12050.
- 91: B. Kiangoontra, C. P. Holmes *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12050.
- 92: <http://www.affymetrix.com/>
- 93: <http://www.nimblegen.com/>
- 94: K. Takahashii, K. Seio, M. Sekine, O. Hino, M. Esashi *Sensors & Actuators B* 2002, 83, 67.
- 95: J. B. Fan, X. Chen, M. K. Halushka, A. Berno *Genome Res.* 2000, 10, 853.
- 96: R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart *Nat. Genet.* 1999, 21, 20.
- 97: A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Homes, S. P. A. Fodor *Proc. Natl. Sci. USA* 1994, 91, 5022.
- 98: D. W. Selinger, K. J. Cheung, R. Mei *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1262.
- 99: R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart *Nature America Inc.* 1999, 21, 20.
- 100: Hacia, J. *Nature Genet.* 1999, 21, 42.
- 101: S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. J. Yue, C. Nelson *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 974.
- 102: W. Fisher, M. Zhang *Automation Sci. and Eng. IEEE trans.* 2007, 4, 488.
- 103: *Brevet*: R. C. Gamble 1996, 5958342 U.S. Classification
- 104: T. R. Hughes, M. Mao, A. R. Jones, J. Burchard, M. J. Marton, K. W. Shannon, S. M. Lefkowitz *Nat. Biotech.* 2001, 19, 342
- 106: G. Macbeath, S. L. Schreiber *Science* 2000, 289, 123.
- 107: V. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi *Nat. Gene. Sup.* 1999, 21, 15.
- 108: J. Kimura, Y. Kawana, T. Kuriyama *Biosensors* 1989, 4, 41.
- 109: <http://biopuces.genotoul.fr/spotter.php>
- 110: M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown *Science* 1995, 270, 467.

- 111: C. Heise, F. F. Bier *Topics in Current Chemistry* 261 springer 2005, p.1
- 112: T. N. Chang *IEEE Trans. Autom. Sci. Eng.* 2006, 3, 187.
- 113: M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996, 93, 10614.
- 114: A. V. Lemmo, J. T. Fisher, H. M. Geysen, D. J. Rose *Anal. Chem.* 1997, 69, 543
- 115: A. P. Blanchard, S. H. Friend *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 953.
- 116: P. F. Xiao, N. Y. He, Z. C. Liu *Nanotechno.* 2002, 13, 756.
- 117: B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 10113.
- 118: U. Maskos, E. M. Southern *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1679.
- 119: G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 4913.
- 120: K. R. Khrapko, Y. P. Lysov, A. A. Khorlin, I. B. Ivanov *DNA sequence* 1991, 1, 375.
- 121: I. B. Ivanov, K. R. Khrapko, B. K. Chernov, A. A. Khorlin *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1991, 24, 189.
- 122: D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmel, V. Shick *Anal. Biochem.* 1997, 250, 203.
- 123: Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A. *Anal biochem* 2000, 278, 123.
- 124: R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O'Connel *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, 94, 1119.
- 125: H. Zhu, J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor *Nat. Genet.* 2000, 26, 283.
- 126: S. R. Rasmussen, M. R. Larsen, S. E. Rasmussen *Anal. Biochem.* 1991, 198, 138.
- 127: A. J. You, R. J. Jackman, G. M. Whitesides, S. L. Schreiber *Chem. & Bio.* 1997, 4, 969.
- 128: R. J. Jackman, D. C. Duffy, E. Ostuni, N. D. Wilmore, G. M. Whitesides *Anal. Chem.* 1998, 70, 2280.
- 129: K. L. Michael, L. C. Taylor, S. L. Schultz, D. R. Walt *Anal. Chem.* 1998, 70, 1242.
- 130: <http://www.biomemsrc.org/>
- 131: P. Pantano, D.R. Walt *Chem. Mater.* 1996, 8, 2832.

I-3 : Criblage pharmaceutique

- 132: www.leem.org
- 133: www.kibron.com

I-4 : Détection d'interactions

- 134: K. M. M Aung, X. Ho, X. Su *Sensors and actuators B: chemical* 2008, 131, 371.
- 135: C. Ayela, F. Roquet, L. Valera, C. Granier, L. Nicu *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 3113.
- 136: H. Su, P. William, M. Thompson *Anal. Chem.* 1995, 67, 1010.
- 137: H. Su, M. Thompson *Biosens. Bioelectron.* 1995, 10, 329.
- 138: H. Su, M. Yang, K. M. R. Kallury *Analyst* 1993, 118, 309.
- 139: E. T. Zellers, M. Han *Anal. Chem.* 1996, 68, 2409.
- 140: R. Bashir *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56, 1565.
- 141: C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 663.
- 142: M. T. Castaneda, A. Merkoçi, M. Pumera *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1961.
- 143: M. Pumera, S. Snahchez, I. Ichinose *Sens. Actuators B* 2007, 123, 1195. 144: M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza *J. Anal. Chem.* 2001, 369, 15.
- 145: K. M. Millan, A. Saraullo, S. R. Mikkelsen *Anal. Chem.* 1994, 66, 2943.
- 146: D. E. Gray, S. C. Case-Green, T. S. Fell, P. J. Dobson, E. M. Southern *Langmuir* 1997, 13, 2833.
- 147: G. Demirel, M. O. Caglayan, B. Garpican, E. Piskin *Surface Science* 2008, 602, 952.
- 148: G. Demirel *surface science* 2008, 602, 952.
- 149: C. Picard, L. Davoust *18ieme congrès français de mécanique* 2007.
- 150 : T. Vo-Dinh, K. Houck, D. L. Stokes *Anal. Chem.* 1994, 66, 3379.
- 151: F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Langmuir* 1998, 14, 729.
- 152: Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C.M. Lieber, *science* 2001, 293, 1289.
- 153: H. Xie, C. Y. Zhang, Z. Q. Gao *Anal. Chem.* 2004, 76, 1611.
- 154: P. Kavanagh, D. Leech *Anal. Chem* **2006**, 78, 2710.
- 155: Y. T. Cheng, C. C. Pun, C. Y. Tsai *Sens. Actuators B* **2005**, 109, 249.
- 156: S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin *Science* **2002**, 295, 1503
- 157: G. Siegel, M Rodríguez, F Sauer, C Abletshauser *Biosens Bioelectro* **2008**, 18, 635.
- 158: M. Culha, D. Stokes, L. R. Allain *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6196.
- 159: V.N. Konopsky, E.V. Alieva *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4729-4735.
- 160 : R.A. Tripp et al., *Nano Today* **2008**, 3, 31-37.
- 161: E. M. Southern *J. mol. Biol.* **1975**, 98, 503.
- 162: C. B. Sampson *Nuclear Medecine Communications* **1996**, 17, 648.
- 163: Z. L. Zhi, Y. Morita, S. Yamamura *Chem. Commun.* **2005**, 19, 2448.

- 164: W. C. W. Chan, S. Nie *Science* **1998**, 281, 2016.
- 165: M. Han, X. Gao, J. Z. Su *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 631.
- 166: <http://www.aist.go.jp>
- 167: W.G. Cox, V.L. Singer *Biotechniques* **2004**, 36, 114.
- 168: D. Pollard-Knight, E. Hawkins, D. Yeung, D. P. Pashby, M. Simpson *Ann. Biol. Clin.* **1990**, 48, 642.
- 169: F. Mannelli, A. Minunni, S. Tombelli *Bioelectrochemistry* **2005**, 66, 129.
- 170: X. Yao, X. Li, F. Toledo, C. Zurita-Lopez *Anal. Biochem.* **2006**, 354, 220.
- 171: A. Otto *Physics* **1968**, 216, 398.
- 172: Y. G. Tsay *clin chem* **1991**, 37/9, 1502.
- 173: St. John *anal chem* **1998**, 70, 1108.
- 174: C. Nylander, B. Liedberg, *sensors and actuators* **1982**, 3, 79
- 175: B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström *Sens. Actuators* 1983, **4**, 299.
- 176: J. Homola, S.S. Yee and G. Gauglitz, *Sens. Actuators B Chem.* **1999**, 54, 3.
- 177: J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 528.
- 178: X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 151.
- 179: J. Homola, *Chem. Rev.* 2008, **108**, 462.
- 180: U. Jönsson, L. Fägerstam, B. Ivarsson, R. Karisson, K. Lundh, S. Löfas, B. Persson, H. Roos, I. Rönnerberg *BioTechniques* **1991**, 11, 626.
- 181: B. Hock, M. Seifert, K. Kramer *Biosens and bioelec* **2002**, 17, 239.
- 182: H. J. Watts, D. Yeung, H. Parkes *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4283.
- 183: <http://www.biacore.com/>
- 184: K. Matsubara, S. Kawata, S. Minami *Appl. Opt.* **1988**, 27, 1160.
- 185: B. Liedberg, I. Lundström, E. Stenberg *Sens. Actuators B Chem.* **1993**, 11, 63.
- 186: A. K. Sharma, R. Jha, B. D. Gupta *IEEE Sens. J.* **2007**, 7, 1118.
- 187: J. B. Goh et al *analytical Biochemistry* **2003**, 313, 262.
- 188: J. B. Goh et al *sensors and actuators B* **2005**, 106, 243.
- 189: <http://www.axelabiosensors.com/>
- 190: N. Liviu. **2008**. *Habilitation à Diriger Recherches*, Université de Toulouse, LAAS-CNRS.
- 191: S. Weiss, *Science* **1999**, 283, 1676.
- 192 : J.C. Cau, **2008**. *Thèse d'université*, Université de Toulouse, LAAS-CNRS.
- 193: R. C. Bailey, J. T. Hupp *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2392-2398.

Chapitre 2 : Fabrication des biopuces

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, les différents types de biopuces et les différentes manières de les fabriquer. Parmi ces méthodes de fabrication, c'est la lithographie douce, et plus particulièrement le micro contact printing (μ CP), qui a été choisie. Cette méthode de structuration à bas coût permet en effet de baisser considérablement le prix de la biopuce, grâce à l'utilisation du PDMS. En tant qu'approche émergente, il a fallu développer et améliorer divers points liés au dépôt de biomolécules. Le type de support et le type de chimie de surface ont ainsi dû être étudiés selon la molécule à déposer.

II-1 : Fabrication des moules

Pour déposer des molécules par micro contact printing selon un motif précis, un moule, contenant les motifs que nous souhaitons déposer, doit d'abord être fabriqué. Si on considère le dépôt sur le substrat comme un édifice, le moule en est la première pierre.

II-1-1 : Moules à motifs nanométriques

Les moules sont majoritairement fabriqués sur des plaques de silicium de 10 cm de diamètre (4 pouces). Comme nous cherchons à avoir des motifs nanométriques afin de gagner en sensibilité (voir chapitre III), les moules que nous avons fabriqués possèdent des motifs de taille nanométrique. Les moules utilisés ont donc été réalisés par e-beam (I-1-1-c). Après insolation, les moules passent par une étape de révélation puis de gravure ionique réactive (RIE). Cette dernière est une étape importante lors de la fabrication du modèle mère, car les flancs des motifs gravés doivent être le plus droits et plans possibles. Si ce n'était pas le cas, il y aurait un risque que le PDMS reste piégé dans certaines imperfections du moule, lors de la fabrication du timbre, ce qui entraînerait un déchirement de ce dernier lors du démoulage.

Les images 2.1, 2.2 et 2.3, faites à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage (MEB), sont celles de moules en silicium réalisés par e-beam. Bien que le motif de ces images

soit dans chaque cas un réseau de lignes, les dimensions de ce réseau varient. Plus particulièrement, c'est la largeur des lignes insolées qui va changer. Le pas de chacun de ces réseaux (Fig. 2.1, 2.2, 2.3) est de $1\text{ }\mu\text{m}$, mais la largeur des lignes varie selon : 500 nm pour le moule de l'image 2.1, 100 nm pour le moule de l'image 2.2 et enfin 900 nm pour celui de l'image 2.3. Des moules, non montrés ici, ayant pour motifs des réseaux de largeurs de lignes de 200 nm et 800 nm au pas de $1\text{ }\mu\text{m}$ ont aussi été fabriqués. Au final, durant cette thèse, nous avons utilisé des timbres en PDMS avec pour motifs des réseaux de lignes parallèles ayant toujours un pas de $1\text{ }\mu\text{m}$ mais de largeur de lignes (motifs protubérants) de : 100 , 200 , 500 , 800 et 900 nm .

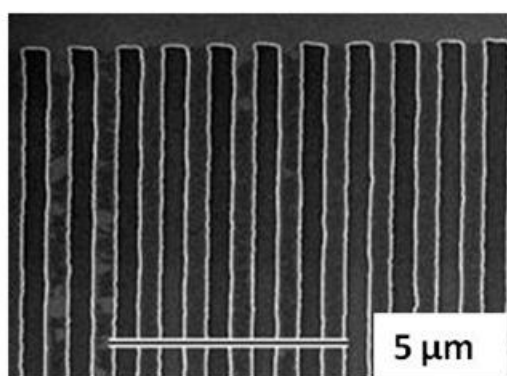


Figure 2.1 : Image MEB d'un moule en silicium réalisé par e-beam. Largeur des lignes : 500 nm au pas de $1\text{ }\mu\text{m}$

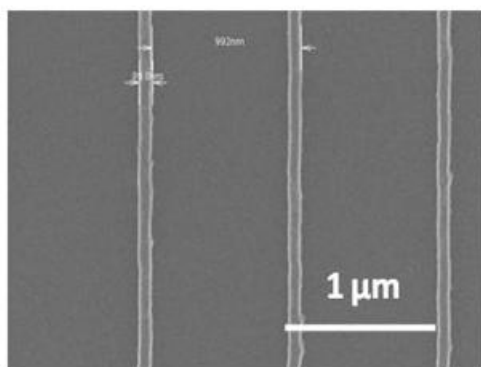


Figure 2.2 : Image MEB d'un moule en silicium, réalisé par e-beam. Largeur des bosses (en gris clair) : 100 nm (pas de $1\text{ }\mu\text{m}$).

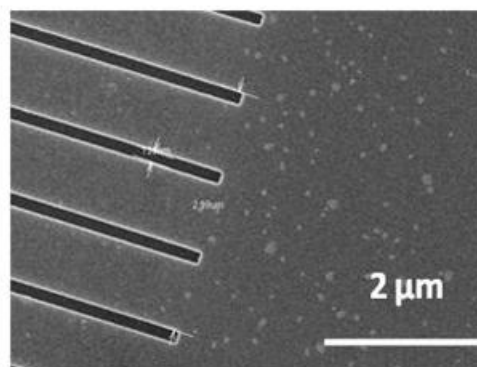


Figure 2.3 : Image MEB d'un moule en silicium réalisé par e-beam. Largeur des creux (en gris foncé) : 100 nm (pas de $1\text{ }\mu\text{m}$).

Une fois gravés, les moules sont ensuite traités avec une couche antiadhésive. En effet, le PDMS ne peut pas être coulé sur le moule sans traitement préalable au risque d'arracher une partie du timbre lors du démoulage et d'abimer fortement les motifs insolés dans la plaque de silicium. Il existe de nombreuses manières de traiter une surface afin de la rendre

antiadhésive. La section suivante sera consacrée à la présentation de la méthode utilisée durant cette thèse.

II-1-2 : Traitement antiadhésif en phase liquide

Plusieurs types de démoulant peuvent être utilisés de différentes manières : composés fluorés ou silanes, dépôt par plasma, en phase liquide ou phase vapeur... A cause du manque de stabilité de la couche de démoulant et du coût engendré par cette procédure, les dépôts par plasma sont les moins utilisés¹. Le plus commun est le dépôt en phase liquide, tant pour sa simplicité et sa rapidité que pour son faible coût². Durant ces 3 ans de thèse, nous avons toujours utilisé le dépôt de silane en phase liquide.

Le traitement en phase liquide permet le dépôt de nombreuses molécules différentes, cependant, notre choix s'est porté sur un silane particulier : l'Octadécyltrichlorosilane (OTS) (Fig. 2.4)

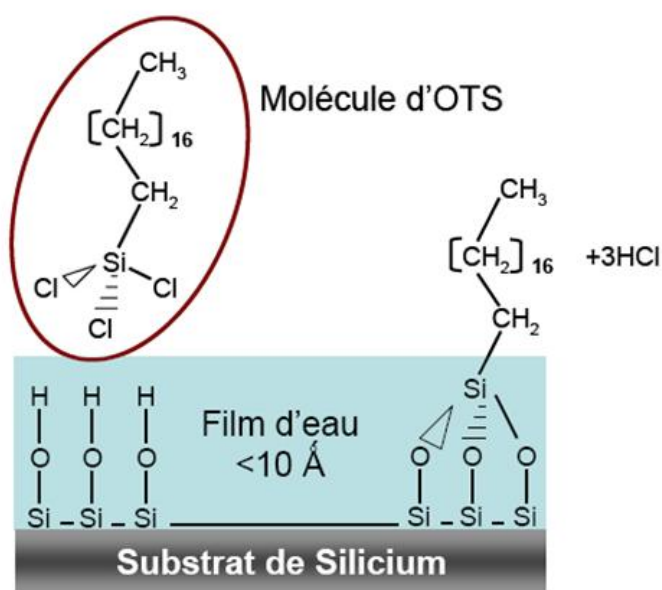


Figure 2.4 : Silanisation d'un substrat de silicium par une molécule d'OTS

Dans le but d'activer la surface du substrat pour la préparer au traitement silane, la plaque de silicium est passée au plasma oxygène (typiquement : 400 W pendant 5 min). Ce traitement permet la formation de groupements silanols (Si-OH) sur le silicium, qui permettent eux-mêmes la liaison, de manière covalente, des molécules d'OTS (Fig. 2.4).

L'OTS possède une chaîne carbonée non saturée, dite inerte, de cette façon aucune liaison chimique ne peut se faire entre le moule traité avec l'OTS et le PDMS.

Le traitement OTS a lieu dans une atmosphère privée d'oxygène (sous azote), pour éviter toute polymérisation de l'OTS sous forme d'agrégats. Pour cette même raison, après avoir été immergée pendant 5 min dans la solution d'OTS, la plaque de silicium est rincée abondamment puis séchée sous azote. Le traitement en phase liquide est simple, rapide et robuste : le moule en silicium peut être utilisé des centaines de fois.

L'étape suivante est donc la fabrication du timbre. Nous allons à présent étudier le polymère utilisé et les différents types de timbres pouvant résulter de ces moulages.

II-2 : Les timbres

Les timbres utilisés tout au long de cette thèse ont été réalisés avec du polydiméthylsiloxane (PDMS). Les propriétés chimiques et physiques de ce polymère en font un candidat idéal pour la lithographie douce (faible énergie de surface, réplique exacte des motifs, facilité du démoulage...) mais aussi pour la réalisation de canaux pour la fluidique³ (bonne étanchéité).

II-2-1 : Propriétés du PDMS

II-2-1-a : Propriétés générales

Le PDMS employé est le Sylgard 184® provenant de la société Dow Corning. Sa synthèse repose sur le mélange de deux composants : une base et un agent réticulant. La base est l'oligomère PDMS et le réticulant un mélange de catalyseur au platine et d'un oligomère hydrogéné (Fig. 2.5).

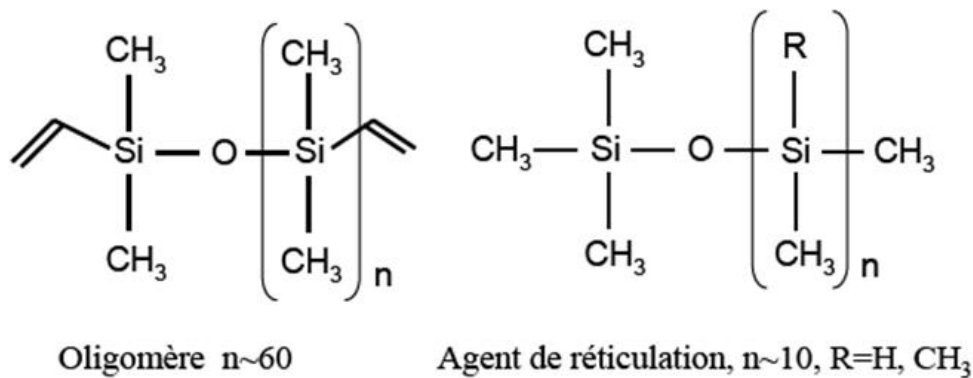


Figure 2.5 : Représentation schématique des deux composants du Sylgard 184®

Les 2 composants du Sylgard 184® sont mélangés (ratio : base/réticulant : 10/1), et dégazés, afin d'homogénéiser l'ensemble. Le mélange résultant est ensuite coulé sur un moule en silicium préalablement traité par un revêtement antiadhésif d'OTS. L'ensemble est ensuite réticulé dans le but d'obtenir un timbre en PDMS solide. Le processus de réticulation commence par l'hydrosilylation⁴ (phénomène activé thermiquement), qui permet la formation de liaisons covalentes entre les groupes hydrosilanes (Si-H) du polymère (contenu dans l'agent de réticulation) et les chaînes carbonées non saturées, tout ceci grâce à la présence du catalyseur au platine. Cette réaction conduit à la formation d'un réseau réticulé de chaînes polysilane (Fig. 2.6) qui donne au PDMS ses propriétés élastomériques. La durée de la réticulation est variable selon la température à laquelle l'ensemble (moule+PDMS) est porté : 2h à 120 °, 5h à 80°, une journée à température ambiante etc.

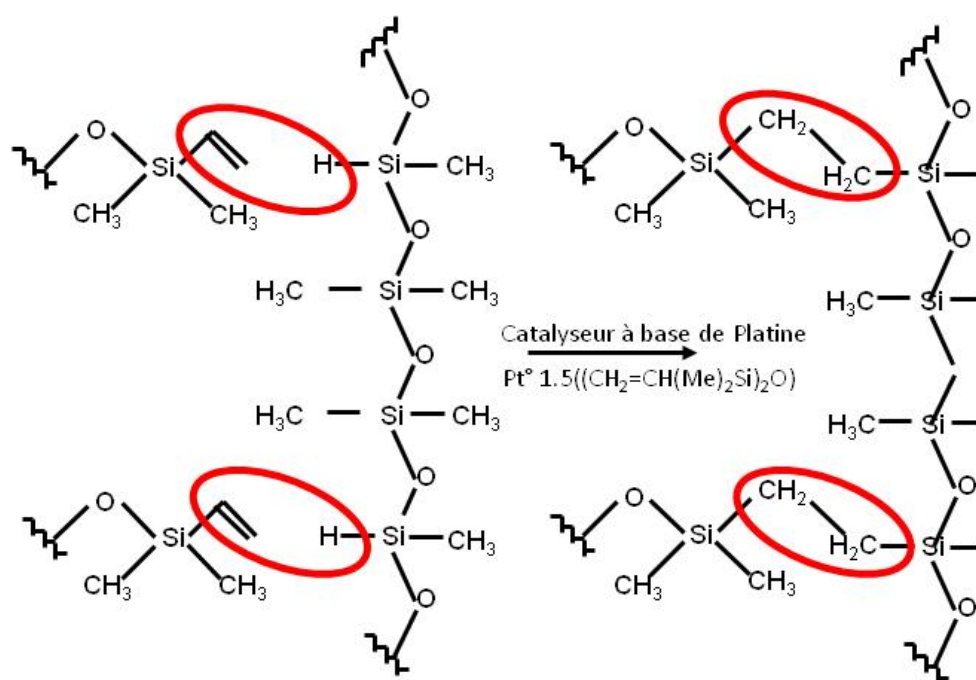


Figure 2.6 : Représentation schématique de la formation de ponts réticulés entre les différentes chaînes de polymères.

Une fois réticulé, le timbre n'a aucun mal à être démoulé grâce à la fois, à sa faible énergie de surface, et au revêtement antiadhésif d'OTS avec lequel le moule a été traité. Au naturel, les groupements méthyls se trouvant à la surface du PDMS le rendent hydrophobe. La grande mobilité des chaînes de polymère du PDMS⁵ permet de changer cette propriété, avec un traitement approprié tel que le plasma⁶⁻⁹ ou le dépôt de polluants sur la surface de l'élastomère¹⁰.

Il est à noter que le PDMS utilisé est composé comme nous l'avons vu d'une base et d'un réticulant composé eux-mêmes par plusieurs polymères différents. Sa masse molaire peut varier de 2200 g.mol⁻¹ à 50 000 g.mol⁻¹.

La différence de mouillabilité entre les surfaces du timbre et du substrat apparaissant être un facteur dominant dans la réussite du dépôt par lithographie douce¹¹, nous avons réalisés des dépôts avec des timbres non traités et des timbres traités au plasma oxygène afin de trouver le procédé optimal pour la réalisation de motifs nanométriques. Une étude de l'influence du traitement plasma selon l'encre déposée et le substrat sur lequel on la dépose est traitée dans la partie suivante.

II-2-1-b : Etude de l'effet du traitement plasma sur le PDMS

L'exposition au plasma oxygène modifie l'énergie de surface et donc les propriétés chimiques du PDMS. Les espèces engendrées par le plasma attaquent les liaisons Silicium-Carbone en séparant les groupes méthyls du reste de la chaîne. Les molécules d'oxygène générées par le plasma peuvent alors se lier, augmentant ainsi le taux d'oxygène à la surface du PDMS (le taux d'O₂ passe de 26 % à 55 %)¹². Au final, une couche d'oxyde de silicium, épaisse de seulement quelques nanomètres est générée à la surface du PDMS, rendant ce dernier hydrophile. Une mesure de l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface du PDMS confirme qu'un traitement au plasma oxygène rend le polymère hydrophile : l'angle avant plasma, de 110°, diminue après plasma jusqu'à 37°. Lors d'un traitement par plasma O₂, des craquelures peuvent être créées à la surface du timbre. Ces craquelures sont dues à la réduction significative du volume engendrée par la fabrication de la couche d'oxyde de silicium. Ce changement de volume provoque une contrainte en tension dans le film et la formation de craquelures à la surface¹³. Ce traitement n'a cependant pas une durée de vie très longue, la mobilité des chaînes de polymère du PDMS étant très grande, les fragments de PDMS diffusent de l'intérieur du timbre vers la couche de surface oxydée¹⁴ augmentant ainsi progressivement l'hydrophobicité du PDMS. Cependant, d'autres mécanismes peuvent être responsables ou accélérer le recouvrement de l'hydrophobicité du PDMS : réorientation des groupes polaires à la surface, condensation des groupements silanols en surface¹⁵ etc.

Durant les expériences réalisées, qui seront présentées et détaillées dans la section II-4-2 et dans le chapitre IV, nous avons pu observer un comportement du PDMS, lors du dépôt par lithographie douce, différent selon que le timbre était ou non traité. Dans le but d'approfondir et d'interpréter cette variation de comportement, nous avons, avec Etienne Dague, fait une étude à l'aide d'un Microscope à Force Atomique (AFM). L'AFM, qui est un outil de caractérisation puissant, est adapté aux mesures de force que nous souhaitons réaliser. En effet, afin d'étudier les propriétés surfaciques du PDMS dans différentes conditions expérimentales (solvant, substrat, traitement...), nous avons mesuré les forces d'interaction entre la pointe de l'AFM et la surface du PDMS. Une explication schématique d'une interaction pointe fonctionnalisée-échantillon se trouve sur la figure 2.7. La figure 2.8 est l'exemple d'un résultat expérimental d'une mesure de force.

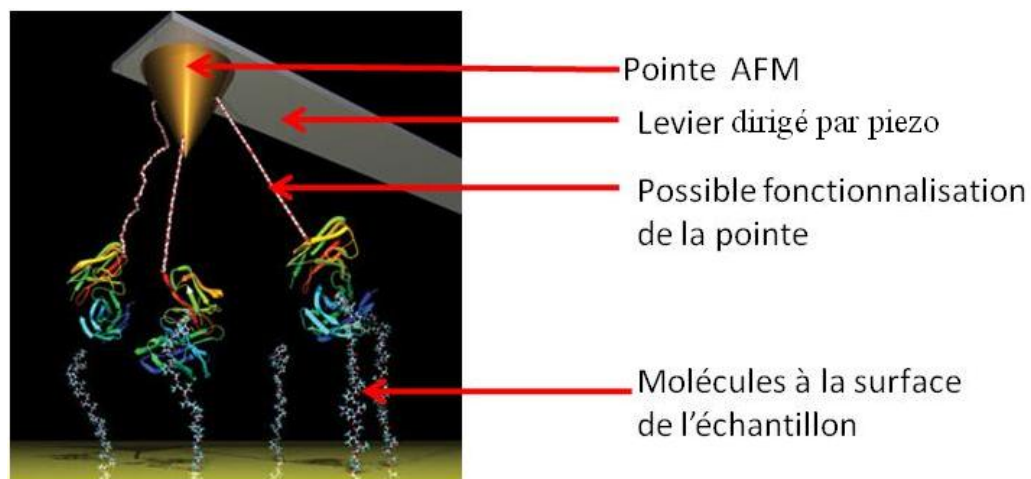


Figure 2.7 : Représentation schématique d'une interaction pointe fonctionnalisée-échantillon d'après [16]. La pointe de l'AFM, fonctionnalisée dans ce cas-ci (il est à noter que la fonctionnalisation n'est pas obligatoire mais peut être intéressante selon les études à mener), se lie à des molécules présentes à la surface de l'échantillon. Cette interaction, entre la pointe et la surface, est transcrite par une variation de la force d'interaction pointe-surface (Fig. 2.8).

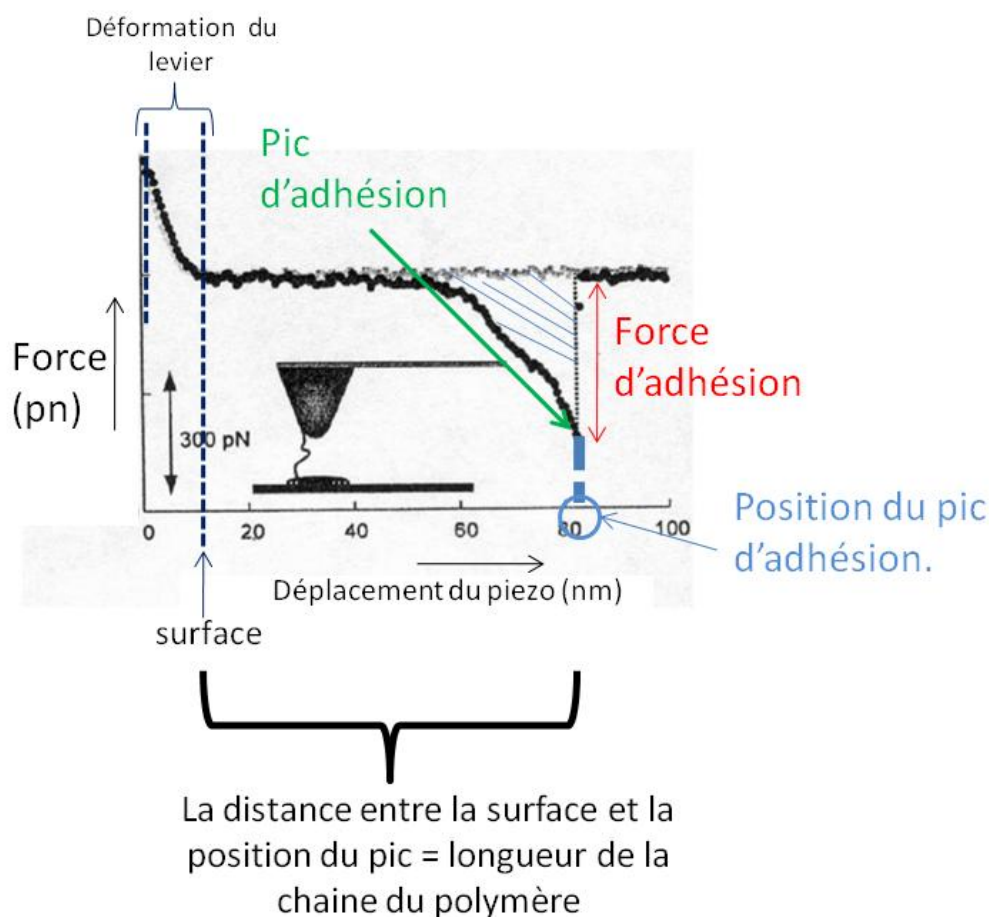


Figure 2.8 : Exemple de résultat expérimental de mesure d'adhésion d'un polymère d'après [17]. L'axe des ordonnées représente une mesure proportionnelle à la force et l'axe des abscisses le déplacement du piezo. La figure représente le déroulement d'une chaîne de polymère à l'aide d'une pointe AFM. Les forces attractives sont représentées par une déflexion négative et les forces répulsives par une déflexion positive de la pointe. La courbe en gris clair représente la courbe d'approche.

Durant une expérience d'approche/retrait, si une interaction a lieu entre la pointe et la surface, il faudra appliquer une force plus importante lors du retrait du levier de la surface. Cela se traduit sur la courbe « force-déplacement du piézo » (Fig. 2.8) par un pic d'adhésion. Dans le cas de la figure 2.8, le pic d'adhésion se produit à environ 70 nm de distance, ce qui indique qu'une molécule de cette longueur a d'abord été déployée avant que la rupture n'intervienne. Dans ce cas ci, nous pouvons dire que la molécule a une longueur de 70 nm, car la distance qui importe pour cette mesure, est la distance entre le piezo (qui dirige le levier) et la surface. Ici, la surface se situe à 10 nm pour le piezo. En effet, la distance entre 0

et 10 nm correspond à une déformation du levier (attraction vers la surface) mais n'entre pas en compte dans la mesure de la longueur du polymère. La force d'interaction peut-être mesurée par l'intensité du pic d'adhésion. Sur la figure 2.8 elle est égale à 450 pN. L'aire du pic d'adhésion (partie hachurée) nous donne l'énergie d'adhésion. L'interprétation des forces courbes-distances nous renseigne donc sur les propriétés de la surface étudiée (déploiement protéines¹⁷, hydrophobicité¹⁸ etc.). Il est donc possible, en fonctionnalisant la pointe selon différentes terminaisons, de mener de nombreux tests et ainsi, possible de déterminer différentes interactions (interactions électrostatique¹⁸, van der Waals^{18, 19}, liaison hydrogène¹⁹ etc.)

La majorité des expériences que nous avons réalisées, pendant lesquelles le comportement du PDMS lors d'un dépôt par lithographie douce a varié, mettait en jeu des molécules terminaisons amines (NH₂), diluées dans l'éthanol ou dans l'eau, déposées sur des surfaces de verre fonctionnalisée chimiquement époxyde à l'aide de timbres en PDMS traités ou non traités au plasma O₂. En tenant compte de ces conditions expérimentales, nous avons listé les interactions à mesurer pour nous permettre de comprendre le rôle de chaque entité lors de l'expérience. Les mesures de force que nous avons réalisées sont répertoriées ci-dessous :

- Pointe nitrure (non fonctionnalisée)/PDMS non traité et traité par plasma O₂ (dans l'eau et dans l'éthanol)
- Pointe nitrure fonctionnalisée époxyde/PDMS non traité et traité par plasma O₂, (dans l'eau et dans l'éthanol)
- Pointe nitrure fonctionnalisée NH₂/PDMS non traité et traité par plasma O₂, (dans l'eau et dans l'éthanol)

Les pointes nommées au-dessus étant toutes hydrophiles (Si₃N₄ : angle de contact de 17° ; NH₂ : angle de contact de 30° ; Epoxy : angle de contact de 45 °. *NB : mesures réalisées avec de l'eau*), des mesures avec une pointe hydrophobe, sur du PDMS traité et non traité au plasma O₂, ont aussi été réalisées.

Il est à noter que de nombreuses mesures ont été réalisées, et donc de très nombreuses courbes ont été obtenues. En effet deux types de mesure de force ont été réalisés : -courbes de force individuelles, au même endroit (en moyenne 100 courbes)

-mesure en mode « force-volume ». Dans ce mode, une matrice de 16 ou 32 colonnes et lignes quadrille la zone d'analyse. Pour chaque point (soit 256 ou 1024) une courbe de force est réalisée. Nous avons réalisé ces expériences sur des zones de 4 ou 25 μm^2 . La force d'adhésion au retrait a ensuite été reportée sur des histogrammes présentant la répartition des forces d'adhésion en fonction de leur occurrence.

Ces histogrammes montrent le nombre d'interactions pointe-surface ayant eu lieu, en fonction de la force de cette interaction. Nous pouvons ainsi connaître le pourcentage d'interaction pointe-surface (d'évènements adhésifs), encore appelé pourcentage d'adhésion, ayant lieu selon le type de traitement appliqué à la surface, la fonctionnalisation de la pointe, la force moyenne de l'adhésion etc.

Dans la suite, seuls quelques résultats moyennés durant cette section seront présentés. En particulier, les cas non adhésifs seront signalés mais non présentés, afin de ne pas surcharger l'écriture.

Pointe nitrure (*représentation schématique*): (angle de contact : 17°)



PDMS non traité, mesure dans l'eau.

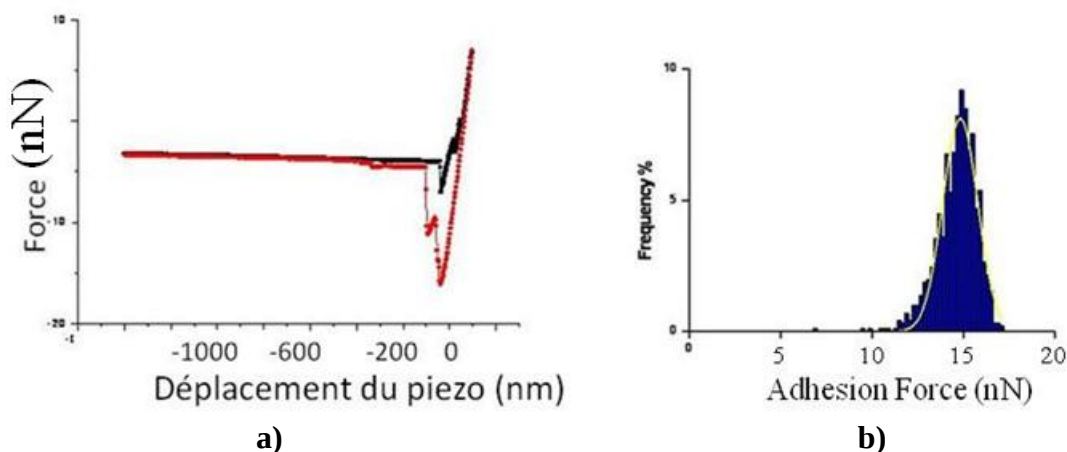


Figure 2.9 : Analyse du PDMS non traité dans l'eau avec une pointe nitrure. a) Courbe de force individuelle. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.

L'analyse de ces courbes nous donne un pic d'adhésion aux alentours de 5 nm avec une force de $14,8 \pm 1,0$ nN. Dans ce cas ci il y a eu 100% d'adhésion, soit une interaction

pointe-surface pour chaque expérience. Les 5 nm peuvent s'expliquer par le fait que le pic de la courbe noire (approche) correspond à la surface et n'est pas situé à 0 nm. Ce pic nous sert de référentiel et de 0. Entre le 0 donné par la courbe d'approche et la position du pic d'adhésion, il n'y a que peu de distance (0 à 5 nm).

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'eau.

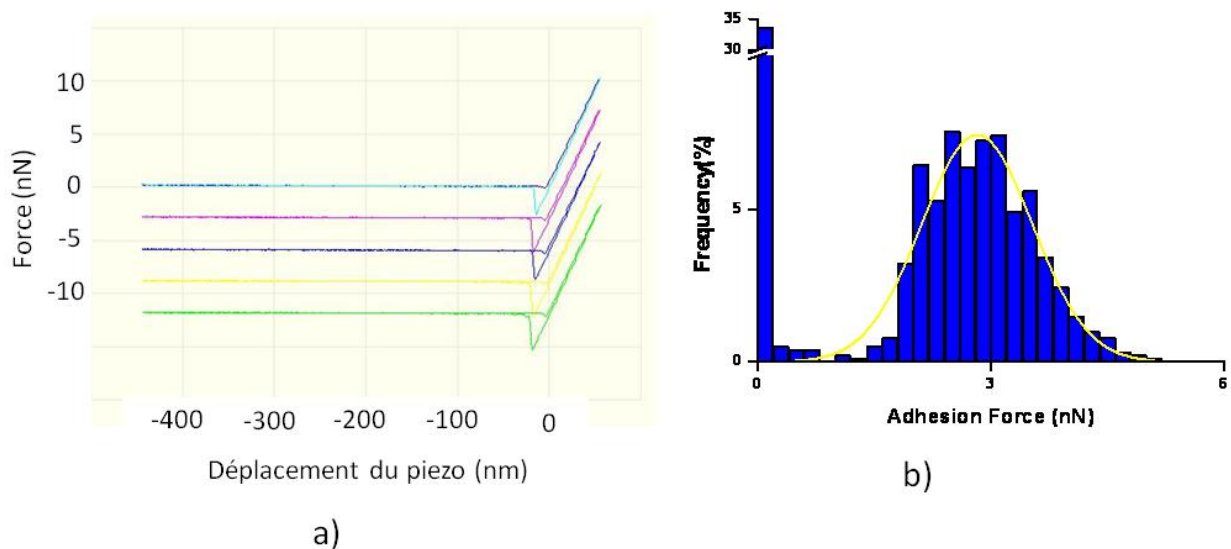


Figure 2.10 : *Analyse du PDMS traité dans l'eau avec une pointe nitrure. a) Courbes de force individuelles. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.*

La force d'adhésion entre le PDMS et la pointe nitrure est de $2,8 \pm 0,7$ nN lors d'un traitement par plasma oxygène avec un pic situé à 20 nm. La force d'adhésion est bien moins forte que pour du PDMS non traité. De plus, il n'y a dans ce cas que 70 % de mesure adhésive.

PDMS non traité, mesure dans l'éthanol.

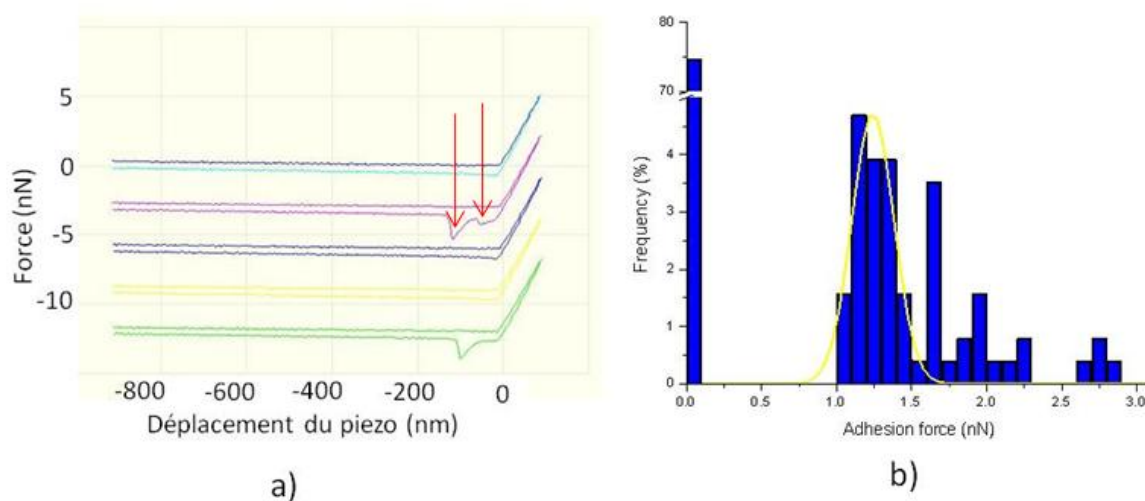


Figure 2.11 : *Analyse du PDMS non traité dans l'éthanol avec une pointe nitrure. a) Courbes de force individuelles. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.*

Lors de ce test, la pointe nitrure présente deux évènements d'adhésion (voir les flèches sur la figure 2.11 a). La force moyenne est de $1,2 \pm 0,2$ nN. En regardant l'histogramme de répartition des forces (Fig. 2.11 b), nous pouvons voir qu'il n'y a que 25 % d'adhésion. En regardant la répartition des pics (Fig. 2.12), il est possible de voir que le premier (et le plus important : 19 % d'adhésion) se situe à 52,6 nm alors que le deuxième (seulement 6 % d'adhésion) se situe à 106,3 nm.

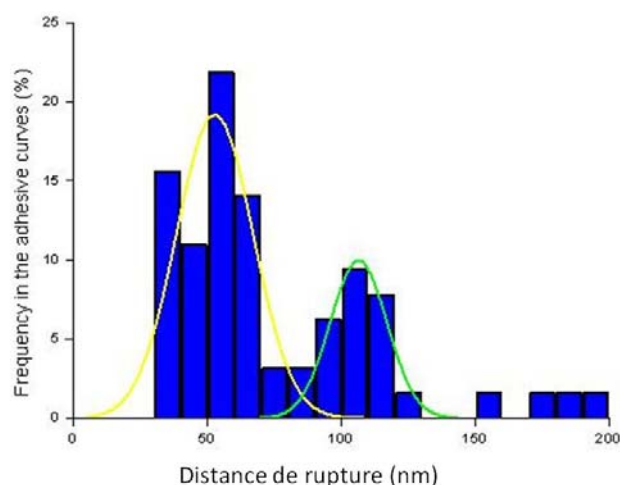


Figure 2.12 : *Histogramme de répartition des distances de rupture lors des mesures entre le PDMS non traité dans l'éthanol et une pointe nitrure. Le premier pic (52,6 nm) a eu 19% d'adhésion et le deuxième (106,3 nm) 6%.*

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'éthanol.

L'analyse de ces mesures, nous a donné une force d'adhésion nulle entre le PDMS traité et la pointe nitrure dans l'éthanol.

Il y a donc une forte diminution de la force d'adhésion entre les tests réalisés avec un timbre traité par plasma O_2 et non traité. Pour le cas d'un test dans l'éthanol, il n'y a plus aucune adhésion après traitement du timbre en PDMS. De même, il y a une nette différence de force d'adhésion entre les deux types de solvant (eau/éthanol) avec une force plus importante dans le cas de l'eau.

Pointe Amine (*représentation schématique*) : (angle de contact : 30°)



PDMS non traité, mesure dans l'eau.

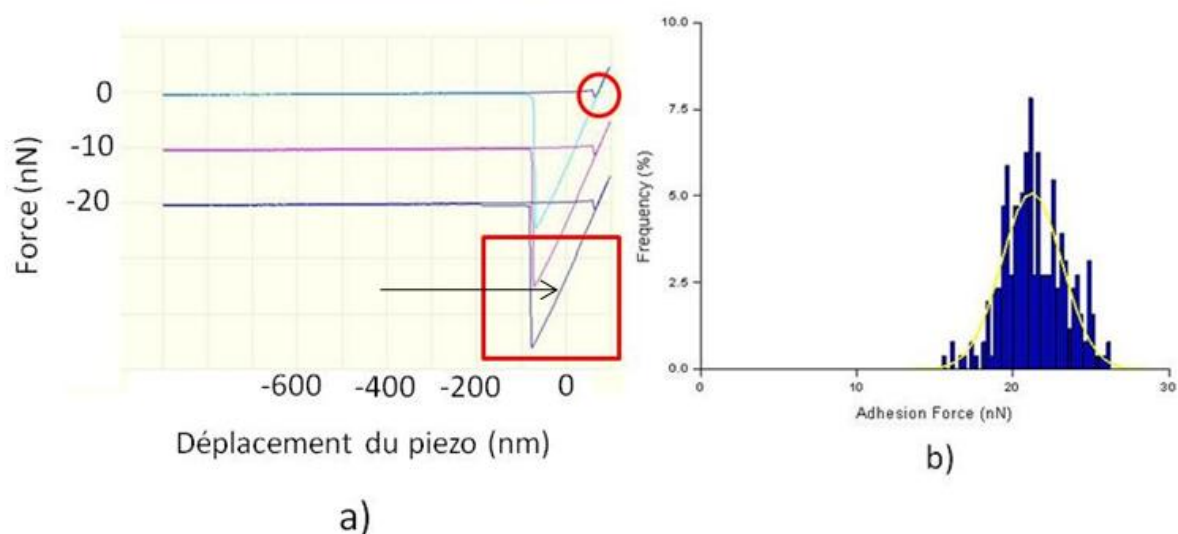


Figure 2.13 : Analyse du PDMS non traité dans l'eau avec une pointe amine. a) Courbes de force individuelles. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.

L'analyse de ces courbes nous donne une force de $24,7 \pm 2,0$ nN avec 100% d'adhésion. La distance de rupture pour cette courbe ci est proche de 0 nm. En effet, la pente (indiquée par une flèche sur la figure 2.13 a) peut correspondre à la déformation du levier. La surface se situe donc proche du pic d'adhésion. La figure 2.13 nous montre des courbes de force typiques avec un saut attractif à l'approche (cercle) puis une adhésion au retrait (carré).

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'eau.

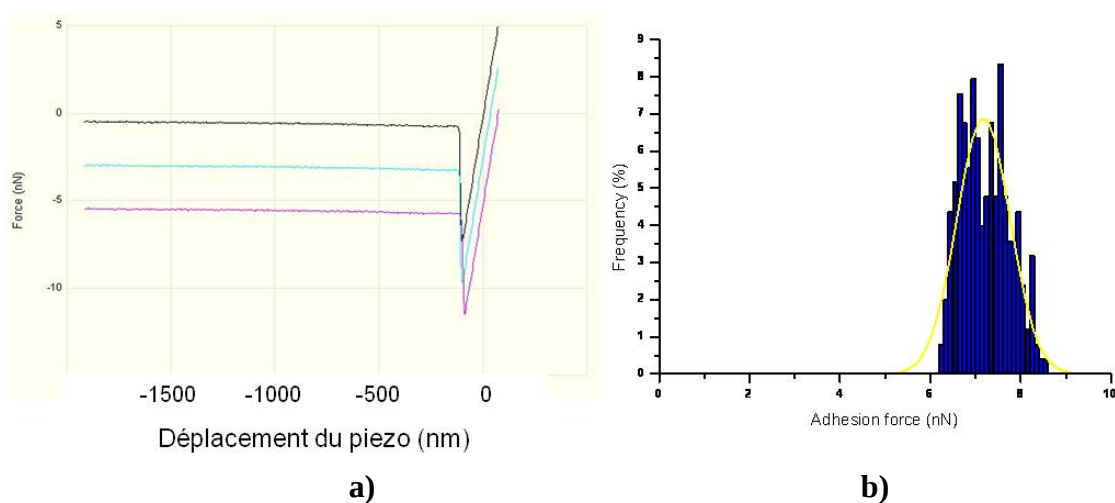


Figure 2.14 : Analyse du PDMS non traité dans l'eau avec une pointe amine. a) Courbes de force individuelles. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.

La force d'adhésion mesurée entre le PDMS traité et la pointe amine est de $7,0 \pm 0,5$ nN avec 100 % d'adhésion. On a donc ici aussi une diminution conséquente de la force d'adhésion avec le traitement plasma (tout comme avec la pointe nitrure).

PDMS non traité, mesure dans l'éthanol.

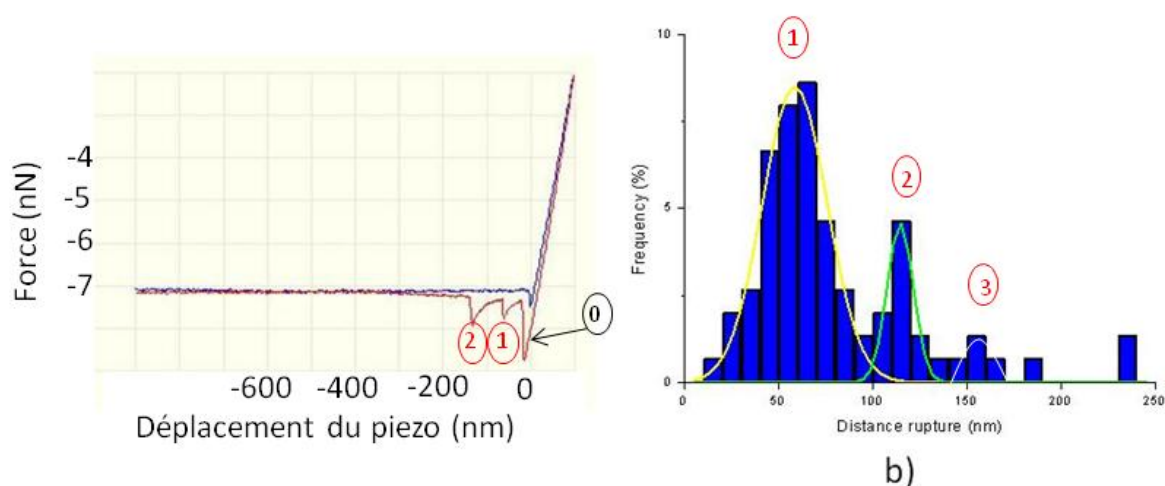


Figure 2.15 : Analyse du PDMS non traité dans l'éthanol avec une pointe amine. a) Courbe de force individuelle. Le premier pic (0) est dû à la déformation du levier et n'est pas représenté sur l'histogramme b). Les deux pics (1 et 2) sont dus au déploiement de molécules

en surface ayant une longueur, respectivement, de 58 et 114 nm. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion.

L'analyse des courbes individuelles nous donne 2 pics distincts (en plus du pic dû à la déformation du levier), soit 2 adhésions à des distances différentes, mais l'histogramme nous donne 3 pics distincts. Cependant, le troisième pic présente une fréquence d'apparition faible et il convient de l'interpréter avec prudence. Toutefois notons que la distance de rupture du premier pic se situe à 58 nm, celle du deuxième se situe à 114 nm, celle du troisième à 160 nm. Il est possible de constater que 114 nm est proche de 58×2 et que 160 nm est proche de 58×3 . Nous sommes ici dans une situation proche, au niveau des distances des pics, de ce que nous avons trouvé lors d'un test entre du PDMS non traité et une pointe nitrure dans le même solvant (éthanol). Il est en revanche à noter que le pourcentage d'adhésion est plus important dans ce cas-ci.

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'éthanol.

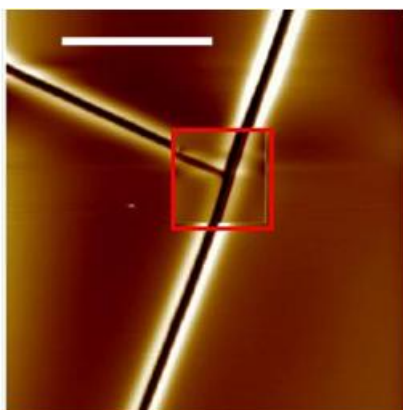
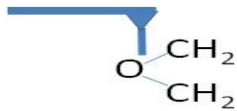


Figure 2.17 : Image AFM en topologie de la surface d'un timbre en PDMS traité par un plasma O_2 . Les traits noirs sont des craquelures du PDMS causées par le traitement plasma O_2 . Le carré représente la zone sur laquelle nous avons réalisé les mesures de force. La barre blanche représente 10 μm .

Dans ce cas, le PDMS est traité par plasma oxygène. Aucune interaction entre la pointe nitrure et le PDMS traité n'a été mesurée. Il est à noter que des forces ont été mesurées à l'extérieur et à l'intérieur d'une craquelure causée par le plasma. Il n'y a pas eu de différence significative entre une mesure prise à l'extérieur et à l'intérieur de la craquelure.

Comme pour la pointe nitrure, il n'y a plus aucune adhésion dans l'éthanol lorsque le timbre est traité. Cependant, les mesures dans les craquelures doivent être interprétées avec précaution dans la mesure où la pointe présente une géométrie pyramidale. En conséquence et en général, lors de mesures dans des craquelures telles que visibles sur la figure 2.17, il est possible que les flancs de la pyramide soient impliqués dans l'interaction mesurée.

Pointe Epoxy (*Représentation schématique*) : (angle de contact : 45 °)



PDMS non traité, mesure dans l'eau.

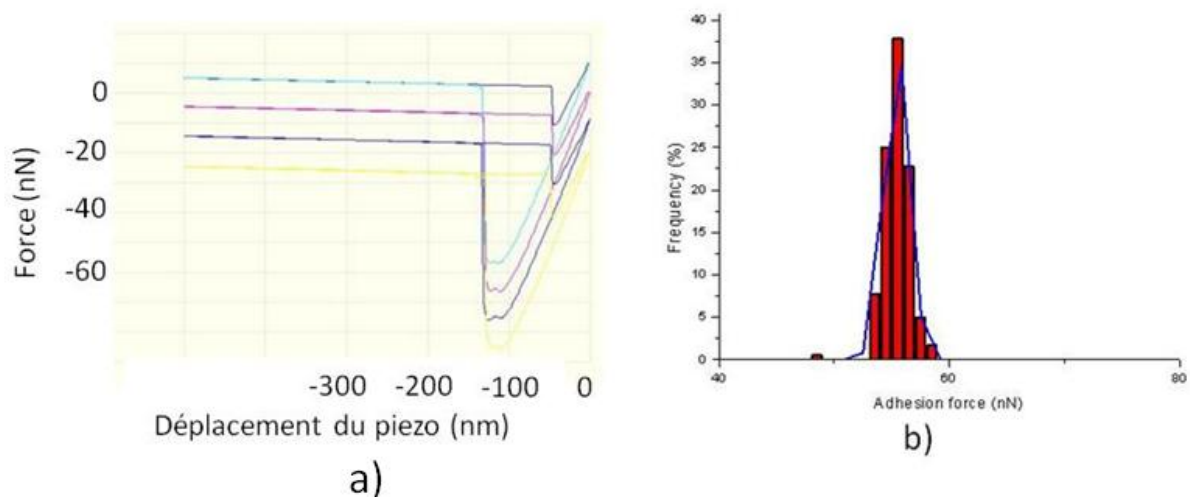


Figure 2.18 : *Analyse du PDMS non traité avec une pointe chimiquement fonctionnalisée époxyde, dans l'eau. a) Courbes de force individuelles. b) Histogramme de répartition des forces d'adhésion. La force d'adhésion est aux alentours de 55 nN avec un pourcentage d'adhésion égal à 100%. Notons la présence d'une force d'approche importante.*

Au vue de l'analyse obtenue, il existe une force d'adhésion relativement grande de 55 nN entre la surface du PDMS non traité et la pointe chimiquement fonctionnalisée époxyde, dans l'eau. Il y a dans ce cas 100 % d'adhésion, donc interaction à chaque mesure de force. Il existe aussi une force d'attraction, tout comme dans le cas de la figure 2.13

(PDMS non traité, eau, pointe amine), mais bien supérieure : elle est ici d'environ 10 nN (mesure moyennée d'après 2.18 a).

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'eau.

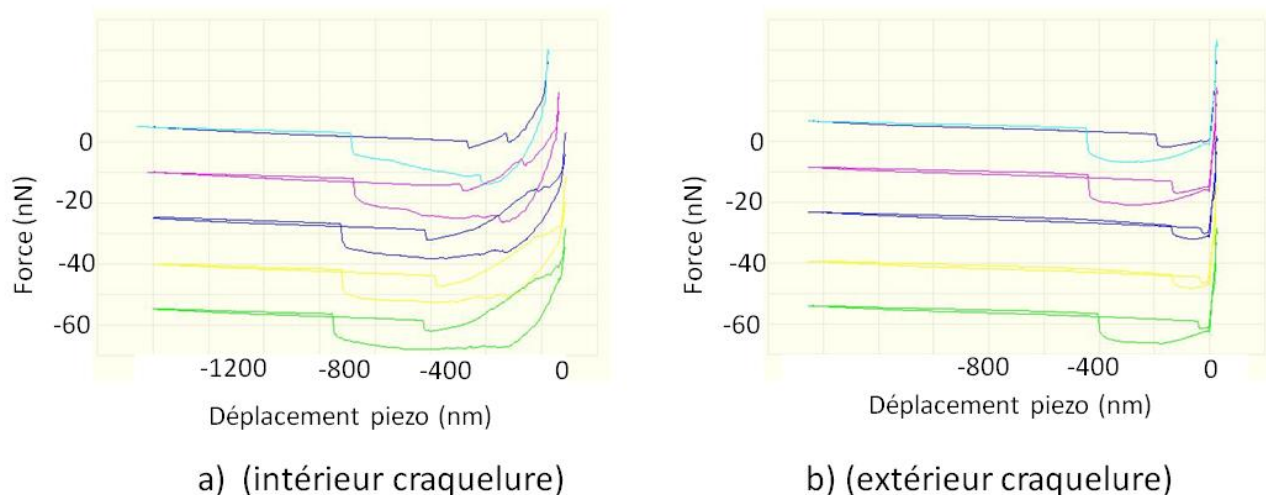


Figure 2.19 : *Analyse du PDMS traité avec une pointe fonctionnalisée époxyde, dans l'eau. a) Courbes de force individuelles réalisées à l'intérieur d'une craquelure. b) Courbes de force individuelles réalisées à l'extérieur d'une craquelure. L'adhésion dans ce cas-ci est faible. La force à l'extérieur est de 4.7 nN et est légèrement inférieure à la force à l'intérieur de la craquelure (proche 10 nN).*

Une analyse de l'adhésion réalisée à l'intérieur et à l'extérieur d'une craquelure provoquée par le plasma O_2 , nous montre une légère différence de chimie entre les deux surfaces. Les courbes mesurées à l'intérieur de la craquelure peuvent avoir été faussées par la forme géométrique de la pointe évoquée plus haut. Les forces restent cependant faibles, en comparaison de celles mesurées sur un timbre en PDMS non traité.

PDMS non traité, mesure dans l'éthanol.

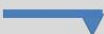
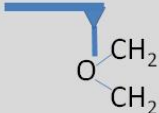
Les courbes de force individuelles ne sont pas présentées dans ce cas, car aucun événement adhésif n'a eu lieu. En effet, nous n'avons relevé aucune interaction entre la pointe fonctionnalisée époxyde et la surface du PDMS non traité dans l'éthanol.

PDMS traité par plasma oxygène, mesure dans l'éthanol.

Dans ce cas aussi, tout comme pour le PDMS non traité, aucune adhésion entre la pointe et la surface n'a été mesurée.

Comme il a été dit précédemment, comme toutes ces pointes avaient des surfaces hydrophiles, des tests sur PDMS traité et non traité ont été réalisés avec des pointes hydrophobes dans l'eau. Les courbes, non montrées ici, ont donné une force de plus de 1 μN dans le cas où le PDMS était non traité, et une force de seulement 7 nN sur du PDMS traité par plasma oxygène. Il y a donc une perte flagrante et d'ailleurs attendue de l'hydrophobie lors du traitement du PDMS au plasma O_2 .

Ci-dessous, se trouve un tableau récapitulatif des différentes mesures ayant été réalisées durant ces expériences. Le terme « PDMS » correspond à du PDMS non traité et le terme « PDMS traité » correspond au PDMS ayant subi un traitement plasma O_2 .

Type pointe Type surface	 Représentation schématique	 Représentation schématique	 Représentation schématique
PDMS + eau	Force : 14,8 +/- 1,0 nN Pic à 40 nm 100% d'adhésion	Force : 24.7 +/- 2.0 nN Pic proche de 0 nm 100% d'adhésion	Force : 55 nN Pic vers 100 nm 100% d'adhésion
PDMS + éthanol	2 pics : 1 ^{er} : à 52,6 nm avec 19% d'adhésion Force : 1.2 +/- 0.2 nN 2 nd : à 106,3 nm avec 6% d'adhésion	3 pics : 1 ^{er} : à 58 nm avec 100% d'adhésion 2 ^{ème} : à 114 nm avec 50% d'adhésion 3 ^{ème} : à 160 nm avec 13% d'adhésion (force faible : entre 1 et 2 nN)	Aucune adhésion
PDMS traité + eau	2,8 +/- 0,7 nN Pic à 20nm 70% d'adhésion	7,0 +/- 0,5 nN 100 % d'adhésion	Mesure prise dans craquelure : 4,7 +/- 0,3 nN
PDMS traité + éthanol	Aucune adhésion	Aucune adhésion	Aucune adhésion

Interprétation :

Les forces mesurées dans le cas où le PDMS était non traité avec l'eau pour solvant peuvent être apparentées à deux types de forces : hydrophobe et déploiement d'une molécule en surface. En effet, lors du traitement du PDMS, les forces d'adhésion mesurées diminuent nettement laissant penser que la surface hydrophile du PDMS y joue un rôle. De plus, l'augmentation croissante de la force d'adhésion avec l'augmentation de l'angle de contact des pointes peuvent laisser penser à une interaction de type hydrophobe. Cependant, au vue de la force mesurée sur du PDMS non traité avec une pointe hydrophobe, et la présence d'adhésion dans le cas d'un PDMS traité, il est clair que d'autres forces sont ici en jeu. Il a été prouvé que le PDMS pollueait les surfaces sur lesquels il est déposé, en relâchant des fragments de faible poids moléculaire²¹⁻²³. Les forces mesurées entre du PDMS non traité et les différentes pointes avec pour solvant l'éthanol sont nettement moins importantes que dans l'eau (voir nulles dans le cas de la pointe fonctionnalisée époxyde), ce qui laisse penser à une interaction avec la surface mais non hydrophobe. Dans ces cas-ci, nous pensons que la pointe fonctionnalisée ou non, s'est liée avec une molécule présente à la surface du PDMS (Fig. 2.20). Cependant, les tensions de surface des deux solvants étant différentes (Eau : $72,7 \cdot 10^{-3}$ N/m ; éthanol : $22,4 \cdot 10^{-3}$ N/m), la différence de force peut être due à l'organisation du solvant à la surface du PDMS. En effet, l'eau ayant une tension de surface plus forte que l'éthanol, il se peut que cette différence de force d'interaction mesurée soit due à la différence de tension de surface.

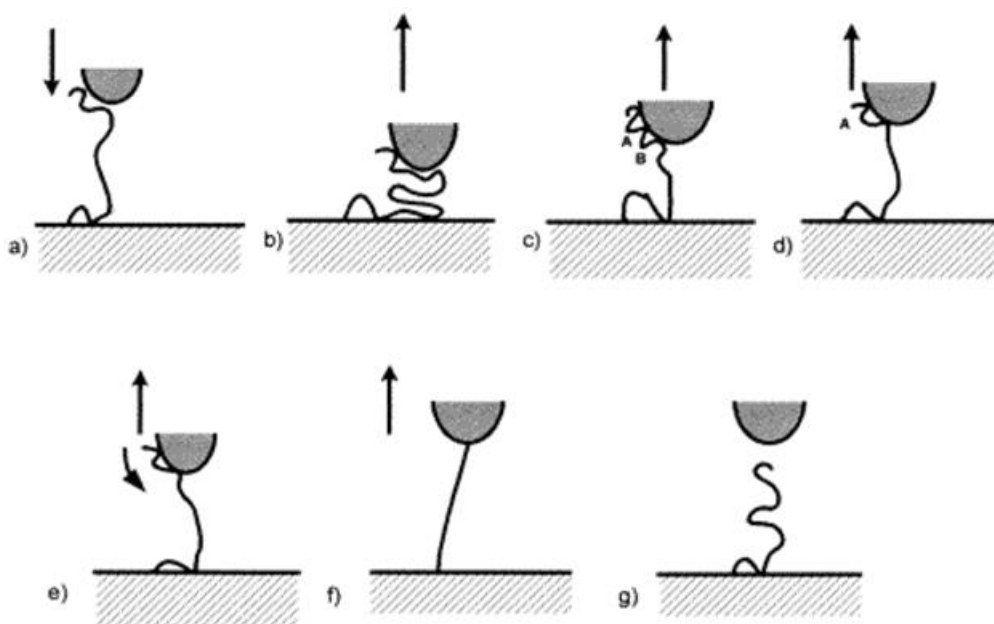


Figure 2.20 : *Différentes étapes de l'interaction pointe-polymère d'après [24]. a) avant interaction avec la pointe, attaché à la surface d'un côté, le polymère est dans un état lisse. b,c) La pointe de l'AFM, lors du contact avec la surface, crée de nombreuses adhésions avec le polymère qui entraîne la formation de boucles. d,e) Le processus de séparation de la pointe et du polymère engendre un stress dans la chaîne de ce dernier qui le décroche de la surface en plusieurs points. Ceci peut être observé sur une mesure de force. f) Lorsque la pointe de l'AFM arrive à ce stade, il n'y a plus possibilité pour elle de glisser le long du polymère. La chaîne de polymère s'étend alors de manière significative. g) Rupture complète de l'interaction entre la chaîne et le polymère.*

Comme le PDMS contamine les surfaces sur lesquelles il est posé avec des fragments, il est tout à fait possible que les interactions mesurées dans les cas du PDMS non traité dans l'eau ou l'éthanol avec les différentes pointes soient dues à des fragments de PDMS se liant à la pointe. De même, selon la figure 2.20, il est possible d'avoir différents stades dans ces liaisons. En effet, le polymère est capable d'être dans une configuration repliée mais aussi allongée. Lors de l'interaction entre la pointe et le polymère à la surface, il est possible qu'en se dépliant, la pointe glisse le long du polymère (Fig. 2.20 d,e) et ne se sépare complètement de lui seulement après plusieurs détachements à divers endroits du polymère et de la pointe²⁴⁻²⁵. Cette explication est corrélée par les multiples pics observables lors des tests entre le PDMS et les pointes de type nitrure et celles fonctionnalisées par des fonctions amines. En effet, ces pics, proches dans la distance (premier pic : pointe nitrure : 52,6 nm ; pointe fonctionnalisée amine : 58 nm. Second pic : 106 nm ; 114nm ; Troisième pic (pointe amine) : 160 nm), peuvent correspondre à un étirement du polymère puis une séparation définitive entre la chaîne et la pointe. Il est à noter qu'entre le premier et le deuxième pic de chaque cas nous sommes proches d'un facteur 2, et qu'entre le deuxième et le troisième pic des mesures réalisées avec la pointe fonctionnalisée amine, nous sommes proches d'un facteur 3. Ceci renforce l'idée d'une élongation du polymère avec un détachement puis une rupture.

Des tests sur des différents types de PDMS ont déjà été menés par plusieurs équipes²⁴⁻²⁶. Les résultats trouvés par Al-Mawaali et al. donnent un pic à 20 nm pour un PDMS de poids moléculaire de 3000 g.mol⁻¹ et des pics à 28 nm et 83 nm pour un PDMS de poids moléculaire de 15000 g.mol⁻¹. Le poids moléculaire du PDMS a donc une grande influence sur les différentes adhésions. Lorsque le poids augmente, il y a apparition de

multiples pics, qui reculent et s'étendent. Comme le PDMS que nous utilisons peut avoir un poids moléculaire important (> 15000), les deux pics que nous trouvons dans certains cas peuvent donc être dû à une longue chaîne de polymère se liant à la pointe et s'étirant jusqu'à la rupture.

La différence d'adhésion entre le PDMS traité et non traité par plasma O_2 (toute chose étant égale par ailleurs) peut s'expliquer par le fait que le traitement plasma est utilisé pour nettoyer le PDMS des fragments qui peuvent occasionner une pollution²⁷. Nos résultats concordent donc avec ces observations. En effet, les forces d'adhésion du plasma traité sont beaucoup plus faibles que dans le cas d'un timbre non traité. Il n'y a donc pas interaction, ou du moins, moins d'interaction entre le polymère et la pointe. Le traitement plasma a donc un effet « nettoyant » pour la surface du PDMS.

Les courbes de la figure 2.19 n'ont pas un point de rupture net contrairement aux autres. Ceci peut être dû à la rugosité de la surface et aux chaînes de polymère ayant différentes longueurs. Le retrait et la mise en contact peuvent potentiellement être composés de multiples pics, proches les uns des autres. De plus, comme les chaînes de polymère peuvent s'enrouler sur elles-mêmes, il est possible que ces multiples pics soient chacun une élongation d'une chaîne de polymère. Chaque élongation étant proche des autres, elles sont, au final, inséparables. Il est à noter que la convolution de la pointe peut aussi jouer sur ces mesures de force. En effet, à l'intérieur d'une craquelure (courbe nettement plus « arrondie »), la forme de la pointe peut avoir un effet sur les interactions potentielles entre la pointe et la surface (bords craquelure – cotés pointe). Une dernière explication pourrait être que lors du retrait, le contact entre la pointe et la chaîne de polymère se fait et se défait (le polymère se détache de la pointe puis interagit de nouveau avec etc.). Cependant, les forces de ces tests étant faibles, nous sommes ici aussi dans un cas allant dans le sens du nettoyage du PDMS par le plasma.

Le dernier point que nous discuterons sur ces courbes est la différence de force entre une zone à l'intérieur et une à l'extérieur d'une craquelure. Bien que l'adhésion soit plus forte à l'intérieur d'une craquelure, le PDMS n'est pas dans son état originel. En effet, une étude antérieure à montrer que le fond d'une craquelure en PDMS n'avait pas la même chimie que du PDMS natif²⁸. D'après nos mesures de force, nous pouvons dire que le fond d'une craquelure n'a pas la même chimie que la surface traitée de ce PDMS (la force est plus grande), et qu'il y a potentiellement interaction entre le polymère et la pointe. Le fond d'une

craquelure n'est donc pas aussi « nettoyé » que la surface du PDMS traité. Cependant, vu la faible force d'interaction entre le fond de la craquelure et la pointe, nous ne sommes pas non plus dans un cas où le PDMS est non traité. Selon les résultats de la littérature, le PDMS exposé à un traitement plasma à l'intérieur des craquelures correspond à une configuration entre du SiO_2 et du SiO_3 , ce qui correspond à nos forces d'interaction : plus importantes que pour du PDMS nettoyé mais plus faible que du PDMS non traité.

Conclusion :

Le but de ces expériences était d'étudier le comportement du PDMS soumis ou non à un traitement au plasma oxygène. En faisant varier la fonctionnalisation de la pointe, le milieu liquide du déroulement de la mesure et le traitement appliqué au timbre, nous avons pu tester dans différentes conditions les effets d'un traitement plasma oxygène sur du PDMS. Nos expériences de spectroscopie de force confirment qu'un traitement au plasma O_2 a pour effet de nettoyer le PDMS, c'est-à-dire d'éliminer en surface des résidus de polymère non réticulé²⁵, tels que, par exemple, les molécules que nous avons étirées. En effet, les forces d'interaction après traitement au plasma oxygène sont significativement plus faibles que lorsque le PDMS n'est pas traité. Cependant, lors des expériences, un changement inverse à celui donné par les mesures de l'AFM a été observé : lorsque le timbre en PDMS était traité par le plasma, il se collait à la surface, rendant le retrait du timbre difficile. En effet, sur de nombreux dépôts, des morceaux de PDMS sont restés collés à la surface lors du retrait du timbre. Plusieurs études faites par différentes équipes ont aussi montré que le PDMS traité en vue d'être rendu hydrophile se liait de manière très forte à un certain nombre de surface²⁹⁻³¹ (dont verre et groupement époxyde). Les analyses AFM que nous avons réalisées donnent un résultat contraire à ce que nous attendions : il y a moins d'interaction lorsque le PDMS est traité. Au final, il n'y a pas de concordance entre les expériences au niveau macroscopique (le timbre après un traitement plasma O_2 se « colle » au substrat) et les expériences au niveau submicronique (il n'y a que peu d'interaction entre le PDMS traité et la pointe AFM). En effet, les résultats obtenus par AFM montre bien un nettoyage de la surface du PDMS au niveau submicronique grâce au traitement plasma, mais les expériences réalisées au cours de ces travaux de thèse (II-4-2 et chapitre 4), ainsi que celles d'autres équipes²⁹⁻³¹ montrent un comportement macroscopique complètement différent. Ceci peut être expliqué par le fait qu'on ne voit pas les effets macroscopiques avec la pointe AFM car celle-ci ne mesure des interactions que sur des surfaces de l'ordre de 20nm^2 . En effet, la pointe de l'AFM, de taille

nanométrique et de rayon de courbure de l'ordre de 20° - 35° , ne peut pas être en contact avec une grande surface. La conclusion que l'on peut tirer de ces expériences est qu'à l'échelle de la pointe AFM, le comportement du PDMS est dominé par des événements moléculaires.

II-2-2 : Les timbres classiques

Deux « types » de timbre ont été utilisés pendant ma thèse : les « classiques » et le macrotimbre®.

II-2-2-a : Présentation du timbre : propriétés mécaniques

Comme expliqué précédemment, la réalisation d'un timbre en PDMS se fait en plusieurs étapes : d'abord le moule doit être fabriqué puis silanisé. Le PDMS peut ensuite être coulé dans le moule mère pour donner le timbre désiré. Cependant pour éviter toute déformation du timbre pouvant entraîner un problème lors du dépôt, certaines règles mécaniques et géométriques sont à respecter. Cette section rappellera brièvement l'état de l'art sur la question de la déformation du timbre.

Hui et al.³² ont présenté le cas d'un timbre très allongé suivant l'axe z et comportant un réseau de lignes parallèles à z , de largeur $2a$, séparées par des creux de largeur $2W$. Les creux ont une hauteur h , tandis que l'épaisseur totale du timbre est de $H+h$. (Fig. 2.21)

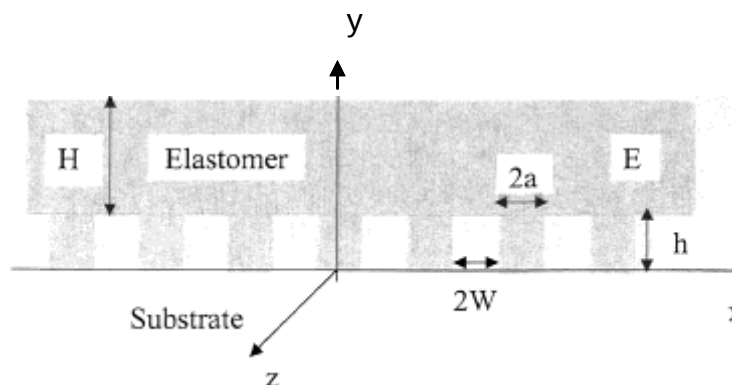


Figure 2.21 : paramètres géométriques d'un timbre d'après Hui et al.³²

Le facteur de forme $h/2a$ est l'un des paramètres les plus importants. $h/2a$ doit être assez grand pour éviter un effondrement du timbre ou « roof collapse » (Fig. 2.22), mais

cependant doit rester suffisamment faible pour éviter la déformation des motifs³²⁻³⁵, appelée « buckling » (Fig 2.23a) ou « lateral collapse » (Fig 2.23b).



Figure 2.22 : d'après [36]. *Roof collapse : contact non désiré entre le timbre et le substrat.*

Le « roof collapse » peut se produire lors d'une trop grande pression appliquée au timbre ou lorsque $h \ll 2W$.



Figure 2.23 : d'après [36]. *Déformation des motifs du timbre du à un facteur de forme trop grand : a) (gauche) : buckling, b) (droite) lateral collapse.*

Le buckling intervient lors du contact entre le substrat et le timbre. L'effet est provoqué par une pression ou une force d'adhésion trop importante qui déforme les structures, ou lorsque $h \ll 2a$. Le lateral collapse ou adhésion des motifs entre eux intervient généralement lors de la séparation du timbre et du moule mère, mais peut aussi se produire lors de l'encrage.

Typiquement, le facteur de forme $h/2a$ doit être compris entre 0.2 et 2^{37-38} afin d'éviter les affaissements ou les déformations latérales du timbre.

II-2-2-b : Utilisation du timbre

Si toutes les conditions évoquées dans le paragraphe au dessus sont respectées, il est possible de fabriquer des timbres en PDMS, comportant des motifs nanométriques et utilisables pour la lithographie douce. Les timbres utilisés avaient pour motifs des réseaux de lignes, le facteur de forme a donc été soigneusement choisi pour éviter une quelconque déformation du timbre. Cinq types de réseaux ont été utilisés : la largeur des lignes variant mais le pas restant toujours le même (1 μm) afin d'être en adéquation avec les restrictions demandées par la diffraction (voir I-5-3 et chapitre III). La largeur des lignes a varié entre 100 nm et 900 nm $\Rightarrow$ 100 nm, 200 nm, 500 nm, 800 nm, 900 nm. La profondeur de gravure a varié selon le substrat utilisé. Les différentes profondeurs des motifs seront données lors de l'utilisation des différents timbres. Les réseaux utilisés formaient des carrés d'une surface égale à 400 μm par 400 μm .

Ci- dessous, une image en champ clair d'un timbre en PDMS (Fig. 2.24). Une vérification rapide des timbres était effectuée après démoulage pour prévenir les risques de déformation ou d'arrachage de certains motifs (potentiellement dû à un traitement silane inhomogène ou vieux, ou à un problème de réticulation).

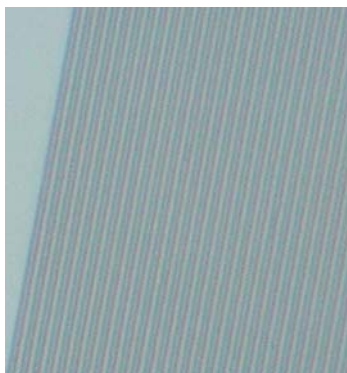


Figure 2.24 : Photographie d'un timbre en champ clair x50 où il est possible d'observer un réseau de lignes de 500 nm au pas de 1 μm . Seule une partie du timbre est visible, le réseau intégral a une taille de 400*400 μm^2 .

Ces timbres, après démoulage (et refroidissement à l'air libre) ont été encrés avec une molécule puis déposés sur le substrat ayant la chimie de surface adaptée à la molécule. Les temps d'incubation et de dépôt étaient courts, en général inférieurs à 2 min, quelle que soit la molécule choisie.

Les images 2.25 a) et b), sont des photographies en champ sombre de dépôt de dendrimères en réseaux de lignes réalisés par μ CP. La taille des motifs est de 500 nm au pas de 1 μ m. Cependant sur l'image b), le réseau en haut de l'image, légèrement plus large que celui d'en dessous, est un réseau ayant une largeur de ligne de 1 μ m au pas de 2 μ m.

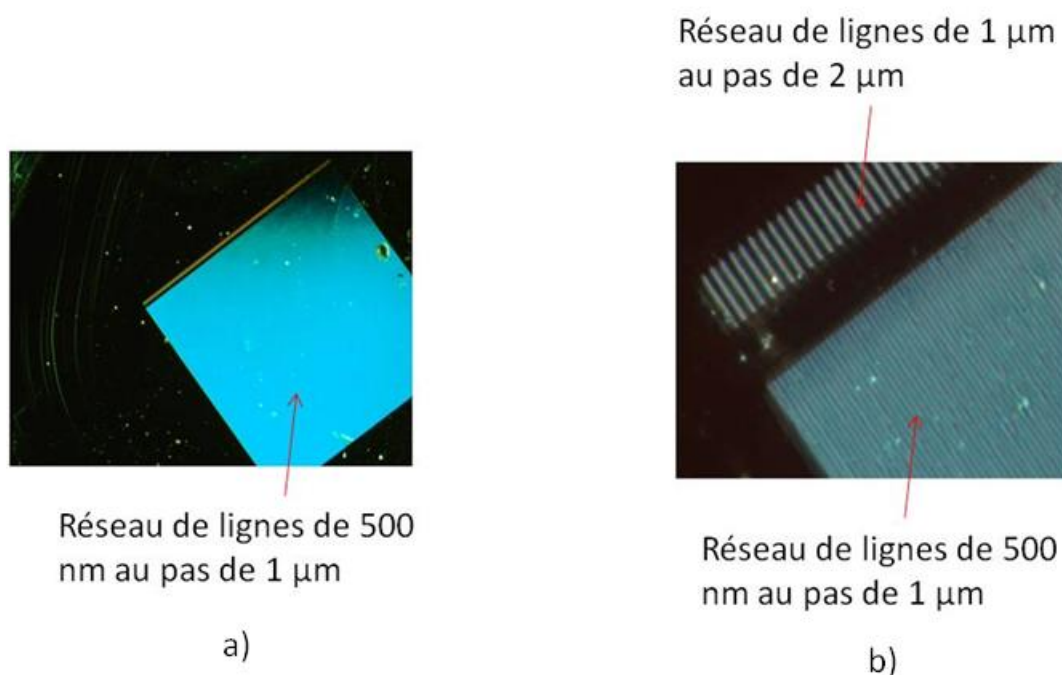


Figure 2.25 : *photographie en champ sombre d'un réseau de dendrimères. a) vue générale du réseau. Le carré est un réseau de 400 μ m par 400 μ m : lignes de 500 nm au pas de 1 μ m. La ligne au dessus est un réseau de lignes de largeur 1 μ m au pas de 2 μ m. b) zoom de la figure a). Le réseau en haut de l'image correspond à la ligne sur la figure a). Il est visible sur cette photographie que le réseau supérieur a des lignes et des espacements plus larges.*

Le champ sombre étant limité à la fois en résolution et en analyse topologique, certains dépôts étaient ensuite étudiés par AFM afin de mesurer la largeur et/ou la hauteur des lignes (Fig. 2.26).

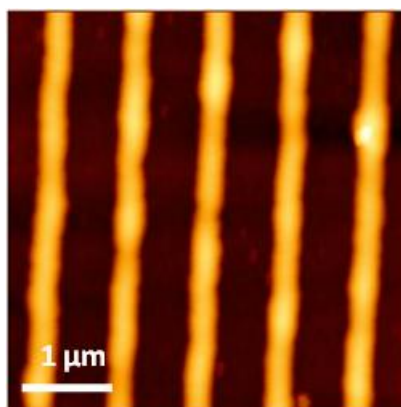


Figure 2.26 : *image AFM d'un réseau de dendrimères réalisé par μ CP. La largeur des lignes est de 250 nm au pas de 1 μ m.*

Les timbres décrits dans cette section sont des timbres « classiques » faciles à réaliser. La taille des motifs peut changer mais le principe du timbre et de sa fabrication reste assez conventionnel. Cependant, avec ce type de timbres, il n'est pas possible de déposer plusieurs molécules différentes en une fois avec un seul timbre, limitant ainsi les potentialités du μ CP.

Afin de remédier à ce problème, nous avons développé le « Macrotimbre ». Le macrotimbre, qui sera présenté dans le prochain paragraphe, a la capacité de pouvoir déposer plusieurs molécules, en même temps, avec un seul et unique timbre.

II-2-3 : Le Macrotimbre

II-2-3-a : Présentation du macrotimbre

Comme dit précédemment, le Macrotimbre permet le multiplexage de molécules par lithographie douce³⁹. Comprenez que grâce à lui, il est possible de déposer plusieurs molécules différentes à la fois, en une seule étape, à l'aide d'un seul timbre en PDMS. Le macrotimbre est constitué de 800 plots en PDMS, chacun ayant un diamètre de 1 mm, liés ensemble par une semelle en PDMS (Fig. 2.27)

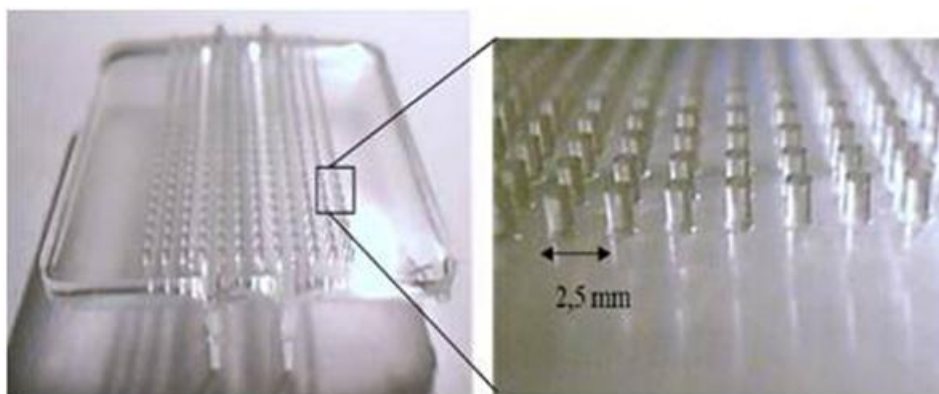


Figure 2.27 : A gauche : vue globale du macrotimbre. Il est constitué de 800 plots en PDMS liés ensemble par une semelle en PDMS. Les 2 lames de verre qu'on l'on peut apercevoir au dos du macrotimbre permettent une manipulation plus facile. A droite : photographie d'un zoom sur les plots millimétriques du macrotimbre. Les motifs micrométriques ou nanométriques (non visibles ici) se trouvent sur le sommet des plots.

Le macrotimbre a été conçu et dessiné pour que chaque plot puisse correspondre aux différents puits d'une plaque de titration (1536 puits) déjà couramment utilisée en laboratoire de biologie. Ainsi, chaque plot peut être encré séparément et indépendamment des autres. Chaque plot peut avoir, sur son sommet, des motifs sans connexion et complètement indépendants des motifs des autres plots. De cette manière, il est possible d'avoir une large gamme de motifs, pouvant descendre jusqu'à l'échelle nanométrique sur chacun de ses plots.

II-2-3-b : Fabrication du Macrotimbre

Pour fabriquer le macrotimbre, il est nécessaire d'avoir un moule en silicium et une armature capable de générer les plots millimétriques dans la conformité des trous des plaques de titration (Fig. 2.28). Cette armature est faite en Polyuréthane (PU), matériau robuste, élastique et non adhésif pour le PDMS. Elle est constituée de deux parties : la supérieure, dans laquelle le PDMS sera coulé, comprenant : des trous pour concevoir les plots millimétriques et des trous taraudés nécessaires pour les vis. La partie inférieure sur laquelle sera posé le moule en silicium comprend aussi des positions pour des vis. Grâce à ses emplacements, les deux parties de l'armature seront vissées ensemble et aucune partie ne pourra bouger, enlevant ainsi le risque de désalignement entre les trous de la partie supérieure de l'armature et les motifs sur le moule en silicium.

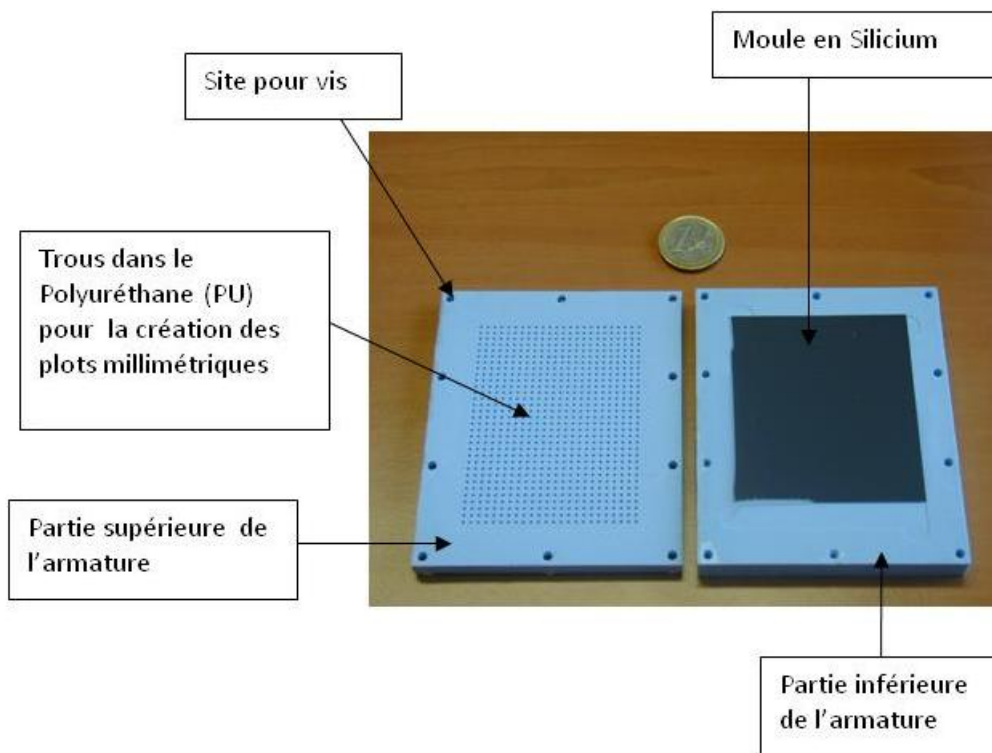


Figure 2.28 : Photographie de l'armature en polyuréthane (PU) du macrotimbre ainsi que du moule en silicium. Le moule est placé sur la partie inférieure de l'armature afin de le maintenir. Chaque trou dans la partie supérieure de l'armature a été conçu pour s'ajuster aux plaques de titration et pour correspondre aux différents motifs gravés dans le moule en silicium.

La procédure pour réaliser un macrotimbre est la suivante : le moule en silicium (avec ou non des motifs gravés) est placé sur la partie inférieure de l'armature. La partie supérieure est alors placée dessus et ajustée afin que les ouvertures soient alignées sur les motifs du moule. Une fois cet alignement fait, les deux parties sont vissées ensemble. Le PDMS peut ensuite être coulé sur l'armature puis dégazé afin d'enlever toutes les bulles d'air potentiellement coincées dans ou sur des motifs. L'ensemble est ensuite mis à l'étuve pendant 7h à 80 °. Une fois le tout refroidi, les vis sont enlevées, puis le macrotimbre démoulé. Il est alors prêt à être utilisé pour le μ CP.

II-2-3-c : Dépôts et tests réalisés avec le macrotimbre

Contamination :

Afin de valider le concept, plusieurs séries de tests ont été faites. La première concernait la « cross contamination ». En effet, il a d'abord été nécessaire de vérifier qu'il

n'y avait aucune contamination entre les plots que ce soit pendant l'encrage, le séchage ou le dépôt. Pour ces expériences, des macrotimbres sans aucun motif au sommet des plots ont été réalisés. Pour cela, une plaque de silicium non gravée a été placée sur la partie inférieure de l'armature. Le reste des étapes de fabrication (coulage du PDMS, dégazage, réticulation) s'est déroulé comme expliqué au paragraphe précédent. Une plaque de titration a été remplie avec une alternance de deux fluorophores : du CY3 (vert) et du CY5 (rouge), dilués dans du PBS. Le macrotimbre a été immergé pendant moins d'une minute dans la plaque de titration. Après avoir rapidement été séché sous un flux d'azote, le macrotimbre a été déposé sur une lame de verre standard non traitée, durant moins de deux minutes. Le résultat de ce test peut être observé sur la figure 2.29.

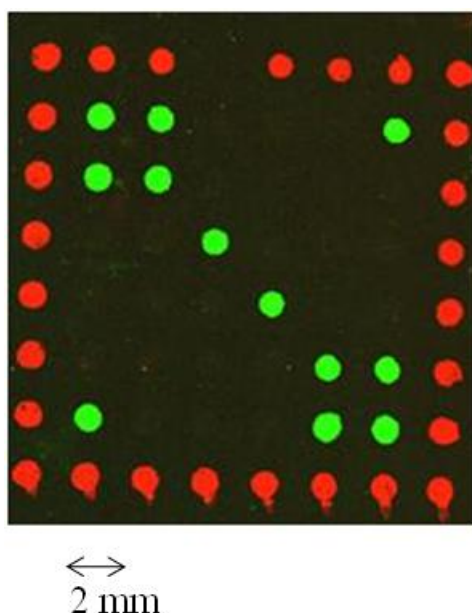


Figure 2.29 : Image en fluorescence d'un dépôt réalisé avec le macrotimbre, encré alternativement avec des fluorophores CY3 et CY5. Aucune trace de contamination durant l'encrage, le séchage ou le dépôt n'est visible. (Expérience réalisée en collaboration avec N. Marsaud (génopole Toulouse))

Cette série de tests a permis de s'assurer qu'il n'y avait aucune trace de contamination entre les plots du macrotimbre lors de l'utilisation de ce dernier comme tampon encreur. Chaque plot semble en effet se comporter comme un timbre unique. Plusieurs expériences ont été nécessaires pour obtenir ce résultat. En effet, le volume optimal a dû être trouvé pour éviter tout débordement et donc toute contamination durant la procédure d'encrage. Après optimisation, nous avons trouvé que les trous des plaques de titration devaient être remplis

avec 8 μL de solution. Au delà de ce volume, il peut y avoir débordement lorsque les plots sont plongés dans les trous de la plaque et donc une potentielle contamination. En conclusion, nous pouvons dire de ces expériences qu'il est possible de déposer jusqu'à 800 molécules différentes, en même temps, en moins de cinq minutes par lithographie douce. De plus, le timbre peut être utilisé jusqu'à 4 fois sans ré-encrage. Les motifs ne subissent pas de dégradation morphologique, mais perdent par contre 95% d'intensité de fluorescence au bout du 4^{ème} dépôt. La plaque de titration peut elle aussi être réutilisée plusieurs fois, sans nécessité de la remplir à nouveau.

Dépôts avec motifs

Après vérification de l'absence de contamination entre les plots durant les diverses étapes du dépôt, nous avons contrôlé la qualité des dépôts avec motifs. Une plaque en silicium a donc été insolée par photolithographie, afin d'obtenir un moule contenant 800 motifs, adaptés au format du macrotimbre. Plusieurs macrotimbres ont ainsi été réalisés et utilisés comme « tampon encreur » pour en vérifier le bon fonctionnement ainsi que son utilité pour la fabrication de biopuces par lithographie douce. Quelques exemples des motifs que l'on peut trouver sur le sommet des plots du macrotimbre sont visibles sur la figure 2.30. Les plots ayant une surface de 3 mm² à leur sommet, il est possible de faire de nombreux motifs différents, de tailles différentes. Ici les motifs sont de tailles micrométriques.

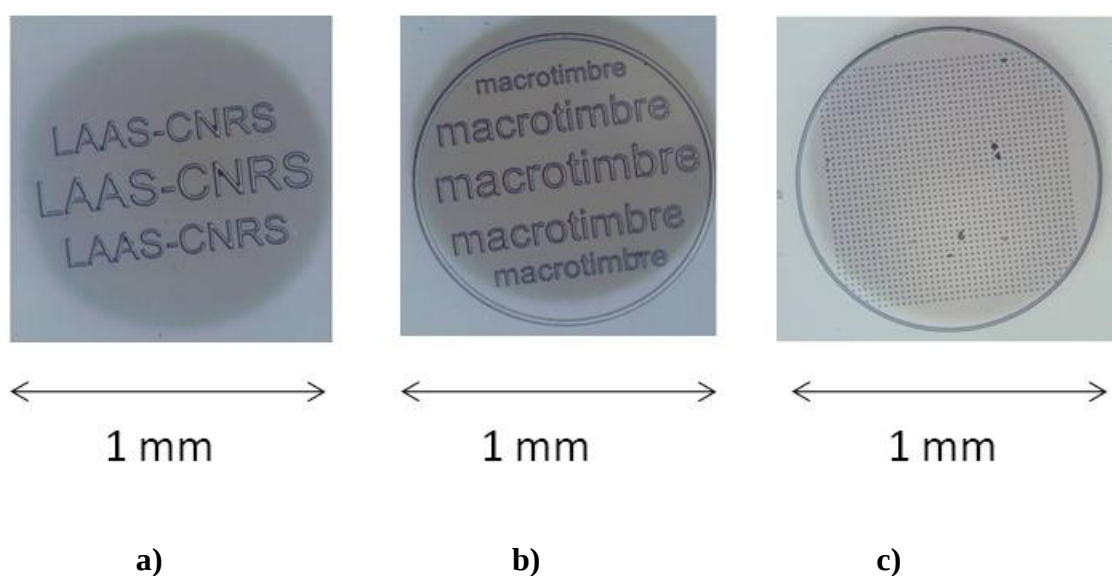


Figure 2.30 : Photographies de trois exemples de motifs se trouvant sur le sommet des plots du macrotimbre. c) Matrice de carrés de 5 μm d'arête.

Les photographies de la figure 2.30 ne sont que quelques exemples de motifs réalisables et réalisés pour le macrotimbre. Ces macrotimbres ont donc été utilisés pour déposer des fluorophores. Le protocole suivi a été le même que pour les tests de contamination. La plaque de titration a été remplie (cette fois avec un seul fluorophore), le timbre immergé, séché puis déposé sur une lame de verre standard. Les résultats de ces tests peuvent être observés sur les figures 2.31 et 2.32. Là encore, le choix de fluorophores provient de la facilité et de la haute sensibilité de l'observation par fluorescence.

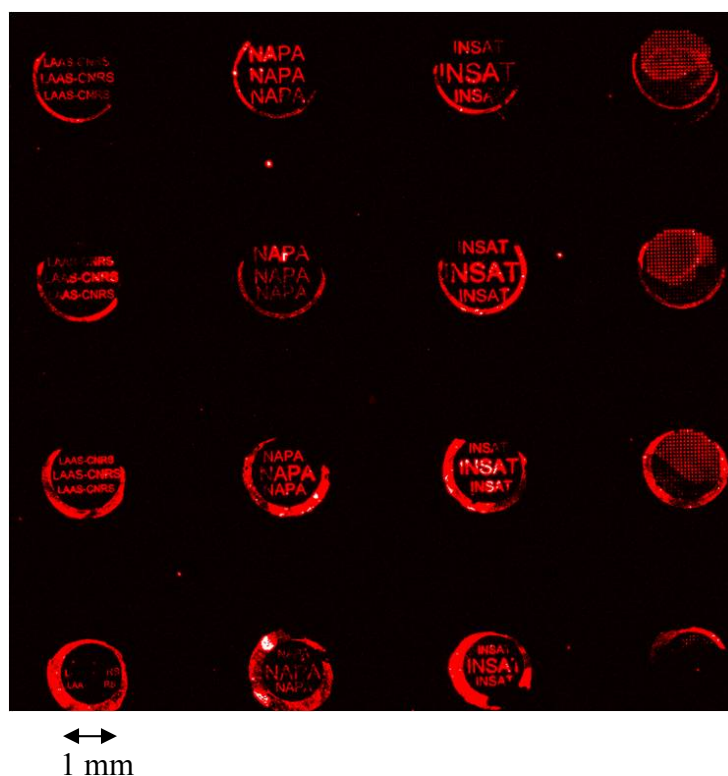


Figure 2.31 : *Image en fluorescence d'un dépôt réalisé avec un macrotimbre contenant des motifs et encre avec un fluorophore CY5. Cette image est seulement une petite partie du dépôt entier. Les zones blanches correspondent à la saturation de la fluorescence.*

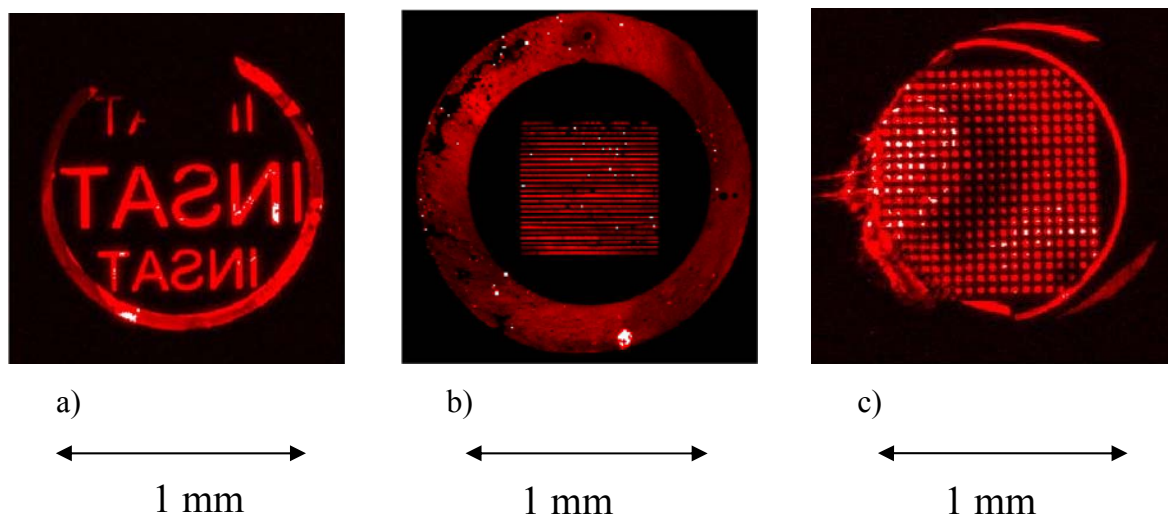


Figure 2.32 : Zooms sur des dépôts individuels. a) logo INSAT b) réseaux de lignes parallèles de largeur $5\ \mu\text{m}$ c) Matrice de carrés de $5\ \mu\text{m}$ d'arrête. Les zones blanches sont dues à la saturation de la fluorescence.

Les différents motifs de la figure 2.31 ont été réalisés en même temps. Les motifs peuvent être observés sur toute la lame de verre, dupliqués avec respect des motifs gravés sur le moule de silicium. La corolle rouge qu'il est possible d'apercevoir autour des motifs (particulièrement sur la figure 2.32 b)), servait à la base de maintien pour éviter l'effondrement du plot sous le poids du timbre, risquant ainsi de détériorer le motif. Elle a par la suite été retirée, car jugée inutile pour les motifs micrométriques. Plusieurs tests de dépôts ont en effet été réalisés, avec et sans corolle sur le timbre, et il est alors apparu que la corolle, dans le cas des motifs micrométriques, n'était pas indispensable (Fig. 2.33) Cependant, elle reste nécessaire dans le cas de motifs nanométriques.

Les parties blanches qu'il est possible d'observer sur les figures 2.31, 2.32 et 2.33 correspondent à une saturation du niveau de fluorescence et peuvent être expliquées par la haute concentration des fluorophores.

L'irrégularité des dépôts peut être expliquée par la méthode utilisée. En effet, tous les dépôts sont réalisés à la main. Dans ces conditions, il est difficile d'appliquer exactement la même force sur tout le timbre ou de déposer le timbre de manière à ce que chaque plot entre en contact avec la surface en même temps. De même, il est quasiment impossible que toute la surface du plot de 1 mm de diamètre, soit mise en contact avec la même force et au même instant sur le substrat. Une augmentation de l'homogénéité des dépôts est attendue avec l'utilisation d'un dépôt automatisé (développement en cours).

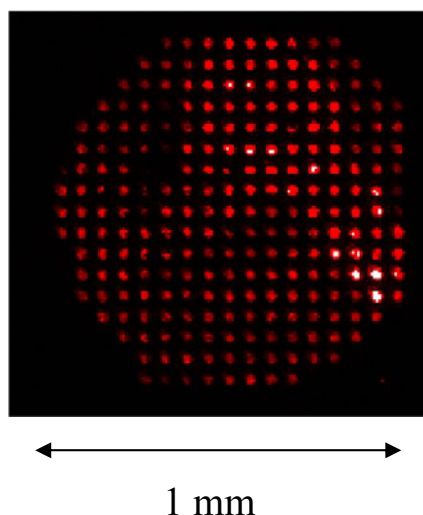


Figure 2.33: Zoom sur un dépôt individuel. Le macrotimbre utilisé ici n'avait pas de corolle pour empêcher l'effondrement du plot, mais le motif est clairement apparent et non abimé.

Après les premiers dépôts de motifs micrométriques, des moules en silicium ont été insolés et gravés plus tardivement, avec des réseaux de lignes nanométriques. Un exemple de ce moule peut être observé sur la figure 2.34. Ces derniers sont constitués de réseaux de lignes de largeur 500 nm au pas de 1 μm (Fig. 2.34 a), b), c)). Le μCP avec le macrotimbre ayant surtout été validé avec des motifs micrométriques, peu de dépôts ont été réalisés avec les motifs nanométriques. Un exemple de dépôts peut être observé sur la figure 2.35. Cette image en fluorescence, montre un dépôt homogène, réalisé avec le macrotimbre, d'un réseau de lignes de 500nm au pas de 1 μm . Le réseau est un carré de 400x400 μm^2 .

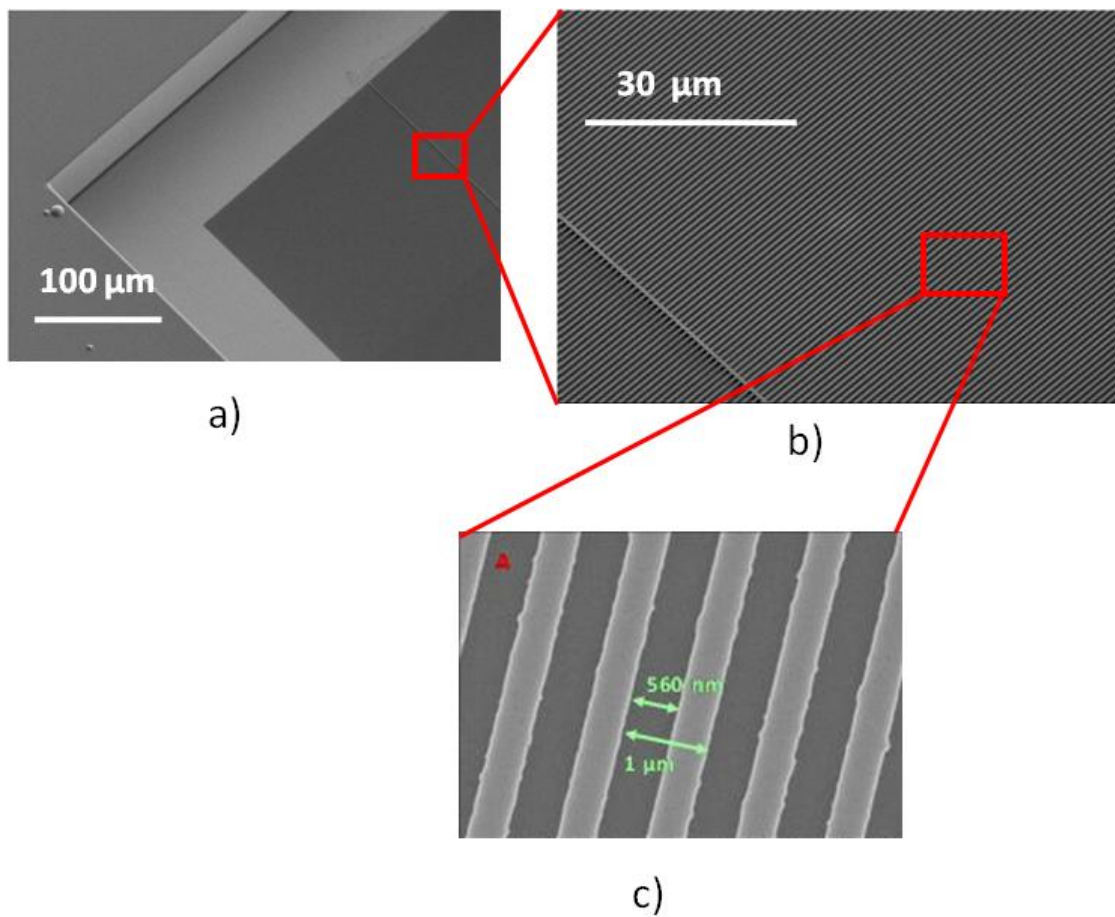


Figure 2.34: Image MEB du moule en silicium ayant des motifs nanométriques réalisés pour le macrotimbre. L'ensemble des réseaux forment des carrés de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. Les réseaux de lignes ont un pas de $1 \mu\text{m}$ pour une largeur de lignes de 560 nm .

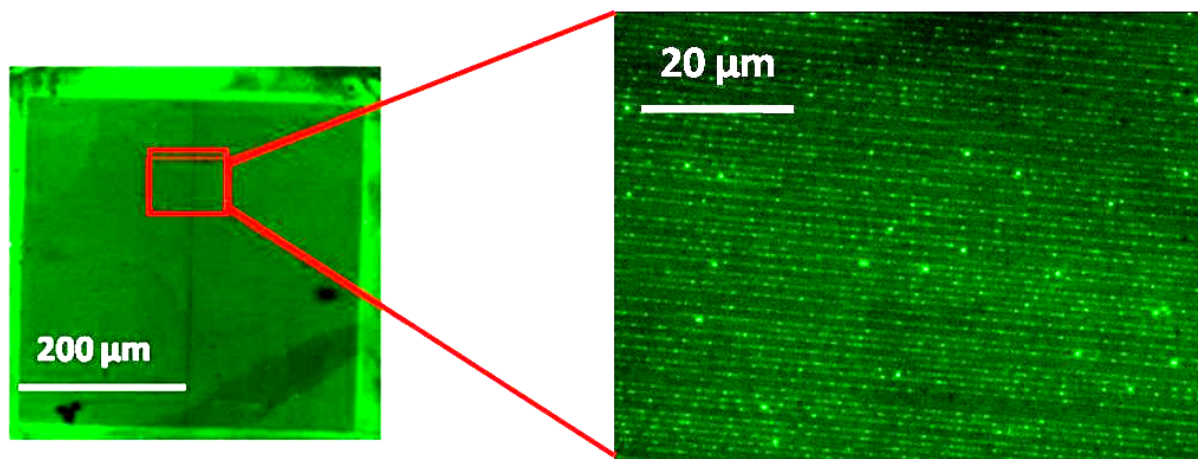


Figure 2.35 : *Images en fluorescence d'un dépôt réalisé avec un macrotimbre contenant des motifs nanométriques et encre avec un fluorophore CY3. La dimension du carré (image de gauche) est de 400*400 μm^2 . C'est un réseau de lignes de 500 nm au pas de 1 μm .*

Les différentes expériences réalisées avec le macrotimbre ont d'abord permis de valider le concept : pas de contamination entre les plots, possibilité de déposer jusqu'à 800 molécules différentes en même temps. Il a ensuite été montré que le macrotimbre agissait exactement comme un timbre classique durant le microcontact printing : respect des motifs, de la forme, de la taille : expériences réalisées à l'échelle micrométrique, puis nanométrique.

L'utilisation du macrotimbre pour déposer les molécules sur un substrat permet donc de combiner le μCP et le multiplexage. En effet, tout en gardant les avantages du μCP , il est possible de déposer plusieurs encres différentes, en même temps, en moins de 5 minutes et en utilisant simplement une plaque de titration comme outil pour encrer le timbre.

De plus les plots ayant une surface de 3 mm^2 à leur sommet, il est possible d'atteindre jusqu'à 10^7 motifs différents sur un macrotimbre. Des tests de redondance peuvent donc être réalisés. Sur un même plot, il est possible d'avoir plusieurs motifs (par exemple plusieurs réseaux) afin d'avoir une répétition dans les tests.

Enfin, des brins d'ADN ainsi que des anticorps ont déjà été déposés avec le macrotimbre, en obtenant des résultats tout aussi satisfaisants qu'avec les fluorophores (tests préliminaires). Cette méthode, accompagnée d'un dépôt automatisé, est donc très prometteuse pour la structuration de biopuces.

Nous avons vu jusqu'à présent des techniques pour déposer les molécules de manière structurée sur une surface : que ce soit le dépôt d'une même molécule ou de plusieurs

molécules différentes. Cependant, pour détecter une bio-interaction, il ne suffit pas de déposer de manière structurée une (ou des) molécule(s) sur une surface. En effet, pour rendre cette dernière apte à recevoir cette molécule, elle doit être préparée. Nous verrons dans la suite de ce chapitre, les chimies de surface étudiées et l'intérêt de ces chimies.

II-3 : Chimie de surface

Une molécule ne peut pas être transférée sur toutes les surfaces, elle ne peut encore moins s'y lier de manière définitive. Pour lier de manière covalente une molécule à une surface, cette dernière doit être fonctionnalisée correctement. La fonctionnalisation dépend de ce que l'on cherche à fixer : le greffage covalent de molécules sur une surface impose el choix d'un couple de fonctions réactives à fort rendement (plusieurs exemples seront donnés dans la suite de la partie). Si la surface est mal préparée, la sonde peut ne pas se fixer ou peut se lier de manière temporaire. La chimie de surface est aussi choisie afin d'éviter au maximum des interactions non spécifiques qui pourraient fausser les résultats. En résumé, la chimie de surface est une étape clé qui doit être rigoureusement choisie et préparée. Nous allons à présent voir deux chimies de surface que nous avons utilisées. La première a servi à la fixation de l'ADN (biopuce) tandis que la deuxième a permis la fixation de peptides (criblage pharmaceutique).

II-3-1 : Chimie de surface pour ADN

Un brin d'ADN peut avoir différentes fonctions chimiques à ses extrémités. En effet, puisqu'elles peuvent être rajoutées chimiquement sur les brins synthétisés, il est possible d'en trouver un grand nombre : amine, thiol, carboxyle, hydroxyle etc. Les brins sondes utilisés durant les expériences avaient tous une terminaison amine : NH_2 (sur le 5' terminal). Afin de lier le brin d'ADN à la surface de manière covalente, nous avons utilisé une molécule liante ayant en surface des groupements aldéhydes⁴⁰. Pour augmenter la sensibilité de la biopuce, c'est-à-dire augmenter l'intensité des signaux d'hybridation, il est nécessaire d'immobiliser le maximum de brins d'ADN sur la surface. Comme les brins n'ont que peu de points d'attache (groupement amine uniquement sur le 5' terminal), il est nécessaire d'avoir une chimie de surface en conséquence. La macromolécule choisie pour lier l'ADN à la surface est un dendrimère. Les dendrimères sont une classe unique de macromolécules synthétiques ayant

une structure fractale, constituée d'un cœur, de branches, de cavités internes résultant des ramifications de la molécule, et de fonctions terminales⁴²⁻⁴⁴. (Fig. 2.36)

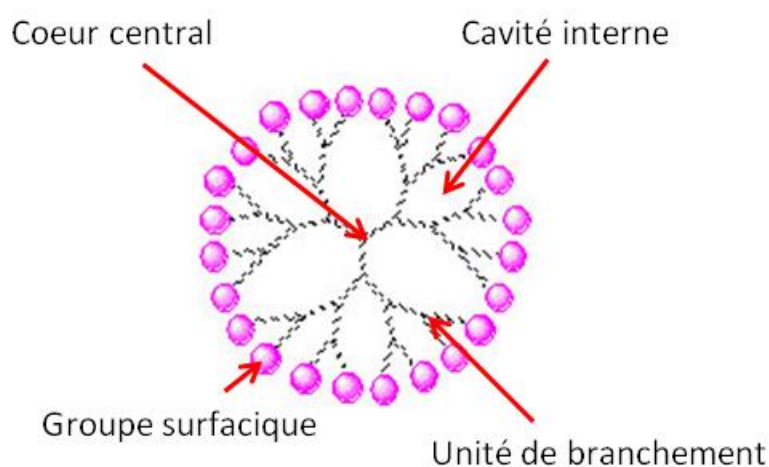


Figure 2.36 : Représentation schématique d'un dendrimère d'après [41].

Caractérisées par une structure tridimensionnelle, ces macromolécules de taille nanoscopique sont apparentées à des polymères hyperbranchés. En effet, leur architecture polymérique permet le contrôle de leurs fonctions chimiques et de leur taille. La taille d'un dendrimère dépend de sa « génération ». Par exemple, la génération 1 a un diamètre de 2 nm avec 12 terminaisons (aldéhydes pour ce cas), la génération 2 a un diamètre de 5 nm pour 48 terminaisons etc. (cf. Fig. 2.37). Les dendrimères choisis pour fonctionnaliser la surface pour lier l'ADN sont des dendrimères de génération 4. En effet, ces dendrimères de diamètre 7 nm possèdent 96 ramifications, ce qui permet de lier de nombreux brins d'ADN et donc d'augmenter le signal lors de l'hybridation. La génération au dessus (G5) possède trop de ramifications : 192, ce qui générerait potentiellement la fixation de l'ADN⁴⁵ à cause de l'encombrement stérique. Une autre possibilité d'utilisation de ces molécules est la réalisation de « dendrilame » (Fig. 2.37). Développée par Trévisiol et al.⁴⁶, le principe est basé sur le greffage covalent de dendrimères G4 sur une lame de verre. Ces dendrimères, neutres, sont phosphorés et possèdent 96 terminaisons aldéhydes, facilitant ainsi grandement une liaison covalente avec de nombreux brins d'ADN terminaisons amine. Le principe ainsi que la représentation de cette lame se trouvent sur la figure 2.37.

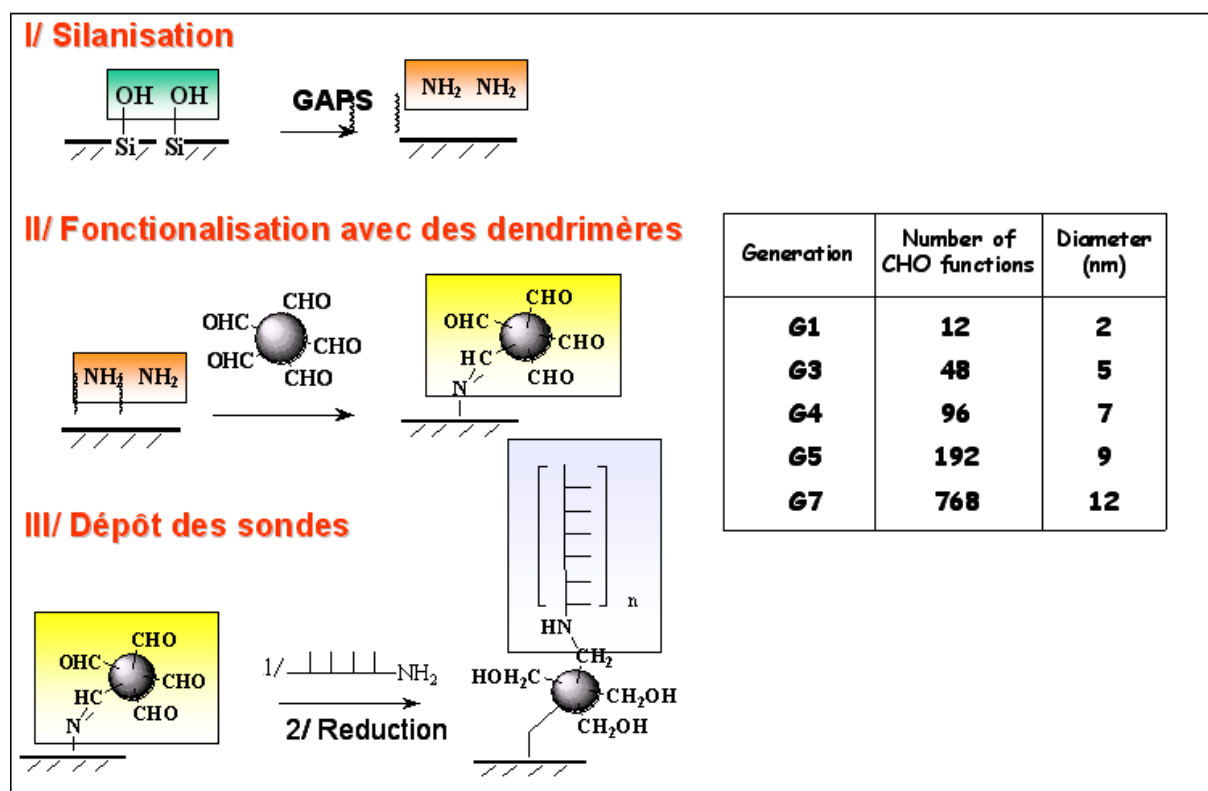


Figure 2.37 : Principe de fonctionnalisation d'une dendrilame et attache des brins d'ADN. I) Silanisation de la lame de verre avec un silane amine. II) Deuxième étape de fonctionnalisation avec le greffage des dendrimères aldéhydes. III) Dépôt des sondes : brins d'ADN terminaison amine, puis réduction chimique afin d'empêcher les autres sites de liaisons de réagir pendant l'hybridation.

Au final, la dendrilame permet d'avoir une surface homogène avec une grande capacité d'immobilisation. Les résultats indiquent en moyenne une capacité d'immobilisation des brins d'ADN deux fois supérieures par rapport aux autres types de surfaces commercialisées⁴⁵.

Dans le but de s'assurer qu'il n'y aura aucune interaction non spécifique de molécules cibles directement avec la surface, la dendrilame, après fixation des premiers brins, subit une réduction chimique. Elle a pour but d'utiliser tous les groupements aldéhydes non occupés par les brins d'ADN, c'est-à-dire de les neutraliser, afin d'éviter les interactions entre ces groupements et les brins cibles, ce qui entraînerait un résultat faussé.

Même s'il est possible d'utiliser les dendrimères pour l'immobilisation de nombreuses molécules, autres que l'ADN, nous avons choisi d'utiliser une chimie de surface différente

pour immobiliser des peptides. Nous allons voir à présent les différentes étapes de la chimie de surface pour peptides.

II-3-2 : Chimie de surface pour peptide

Les peptides utilisés avaient pour but d'être employés pour le criblage pharmaceutique (I-3). Ces peptides étant déjà biotinylés, c'est la streptavidine qui a été choisie comme ligand. En effet, l'interaction streptavidine-biotine étant forte⁴⁷, il n'y avait que peu de risque que le peptide lié à la streptavidine se détache lors de la mise en milieu liquide. Le protocole pouvait donc prendre deux directions (Fig. 2.38) :

- dépôt par μ CP de la streptavidine, puis incubation des peptides,
- dépôt ordonné, par lithographie douce, de peptides sur une couche homogène de streptavidine.

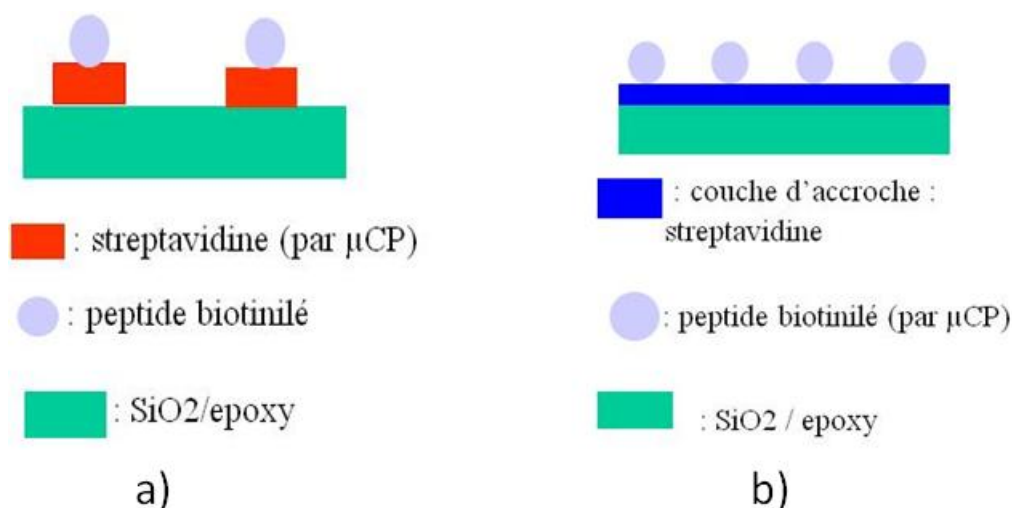


Figure 2.38 : Représentation schématisée des deux configurations possibles :

a) La streptavidine est structurée par μ CP sur la surface.

b) La streptavidine est une couche uniforme.

Afin de simplifier au maximum le protocole, nous avons employé pour les premiers tests, les lames commerciales de streptavidine utilisées par l'unité mixte Pierre Fabre CNRS. Il s'est avéré après plusieurs tests, que les lames n'étaient pas adaptées à l'échelle nanométrique. En effet, en observant une lame à l'AFM, il est apparu qu'elles présentaient des différences de topologie trop grandes pour être acceptables. Sur une zone de 100*100 μ m²,

de nombreuses zones circulaires larges d'au moins $10\ \mu\text{m}$ et présentant des différences de topologie de plus de $5\ \text{nm}$ peuvent être observées (Fig. 2.39). Ces variations étaient trop grandes pour que ces lames puissent être utilisées à l'échelle nanométrique. En effet, il y aurait eu un risque de générer un réseau abîmé lors du dépôt par lithographie douce, ce qui aurait entraîné une variation du signal pouvant être faussée, risquant d'induire une mauvaise interprétation du résultat. Cette solution a donc été rejetée. Nous avons choisi de déposer la streptavidine par μCP sur un substrat ayant la bonne chimie de surface. C'est le groupement époxyde qui a été choisi pour immobiliser la streptavidine. En effet, le groupement époxyde réagit fortement avec les terminaisons amines⁴⁸⁻⁴⁹ situées sur la streptavidine, permettant ainsi à cette dernière de se lier de manière covalente à la surface (Fig. 2.40)

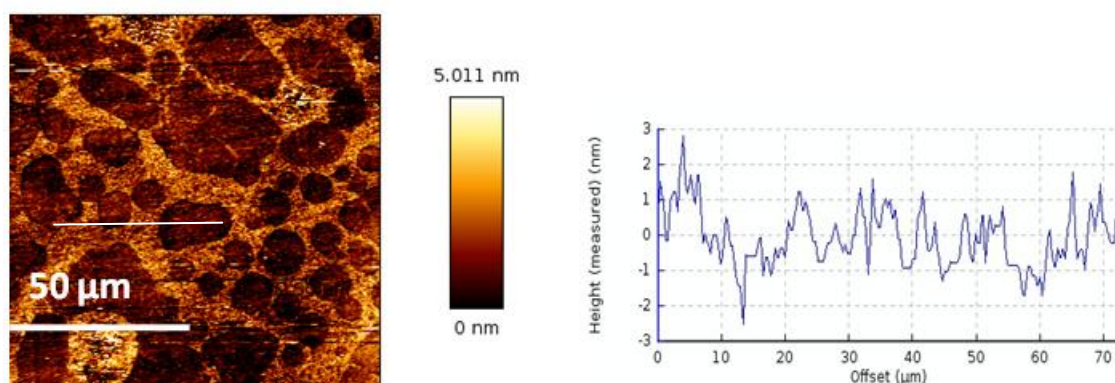


Figure 2.39: Image AFM et vue en coupe d'une lame de streptavidine commerciale.

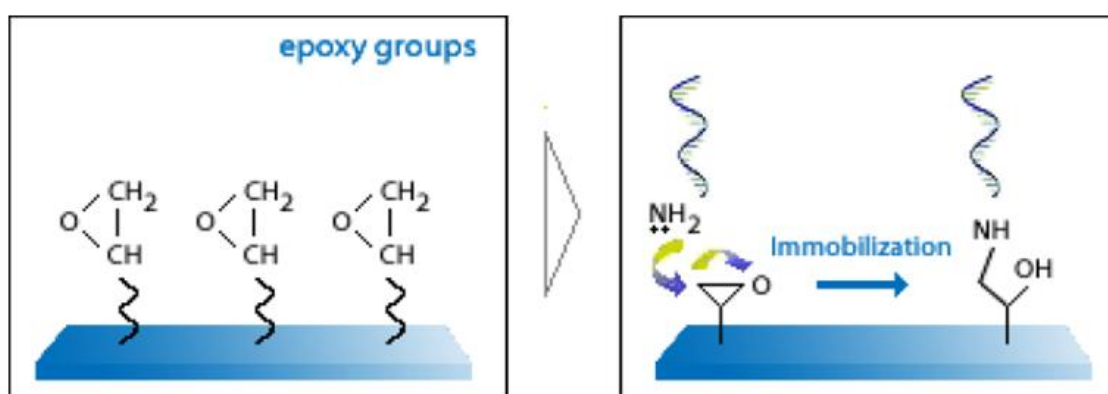


Figure 2.40: Représentation schématique des groupements époxyde et de leur réaction avec des groupements amines d'après [50].

Deux solutions ont alors été envisagées : soit prendre une lame du commerce, soit fonctionnaliser nous-mêmes la lame de verre avec des groupements époxyde. Après avoir observé la lame de verre fonctionnalisée époxyde commerciale à l'AFM, il s'est avéré que la rugosité de la plaque était assez faible (moins de 1nm sur une surface de 50 μm) pour pouvoir être utilisée. Nous avons donc choisi d'utiliser des lames du commerce.

La streptavidine a donc été déposée et structurée en réseau sur la lame de verre fonctionnalisée époxyde. Afin de prévenir les interactions non spécifiques qui pourraient fausser les résultats, des tests dits de « contrôle négatif » ont été réalisés. En effet, il est possible que les molécules cibles viennent se placer dans les creux du réseau formé par la streptavidine, pour réagir directement avec les groupements époxyde en surface. Jean-Christophe Cau a étudié cette interaction non spécifique et son influence sur la variation de l'intensité lumineuse lors d'une détection par diffraction⁵¹. Il a conclu de cette série d'expérience qu'il était possible de détecter l'interaction molécule sonde/molécule cible malgré les interactions non spécifiques ayant lieu entre les groupements époxyde et la molécule cible (Fig. 2.41). En effet, la mesure du gain (I-5-3), nous permet de faire la différence entre une interaction spécifique et une interaction non spécifique. Le suivi de la variation d'intensité lumineuse de la phase I (dépôt streptavidine par μCP) jusqu'à la dernière phase (incubation molécules cibles) de l'expérience, nous permet ainsi de conclure sans erreur s'il y a eu interaction spécifique.

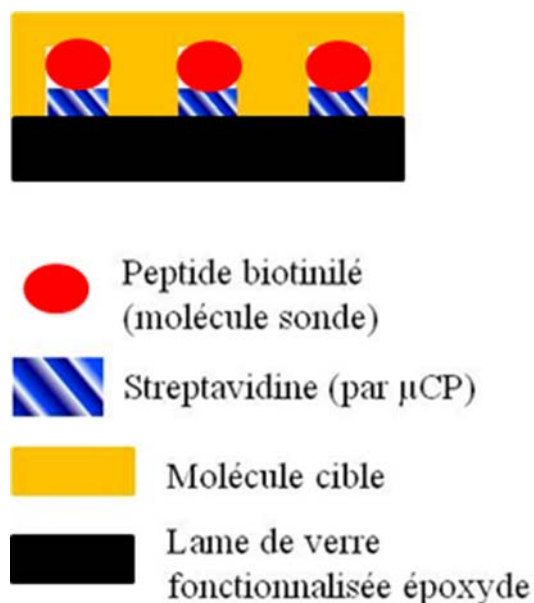


Figure 2.41 : *Représentation schématique d'interactions à la fois non spécifiques de la cible dans les creux et spécifiques sur les lignes*

Durant cette section, nous avons vu comment préparer la surface pour l'immobilisation de la molécule sonde. Cette partie de la manipulation est cruciale. Il est essentiel d'avoir une surface extrêmement bien préparée à l'arrivée de la sonde mais aussi à l'arrivée de la cible. Il est effectivement parfois utile et nécessaire de passiver la surface (avec de l'albumine (BSA) par exemple) afin d'éviter des interactions non spécifiques. Cependant, dans notre cas, aucune passivation n'a été nécessaire grâce au système de détection par diffraction que nous avons développé. En effet, l'étude des variations de l'intensité diffractée montre qu'il est possible de distinguer les événements d'adsorption non spécifique de nature aléatoire, des événements d'interaction spécifiques qui sont spatialement corrélés à la périodicité du réseau diffractif formé par les molécules sondes.

Les différents résultats obtenus lors du dépôt de molécules par μ CP vont à présent être présentés. Trois types de molécules ont été étudiés : streptavidine, dendrimères, et ADN. Elles ont chacune été déposées par lithographie douce sur une surface.

II-4 : Les dépôts de molécules

La lithographie douce permet le dépôt de manière structurée de diverses molécules sur diverses surfaces. Les techniques de lithographie peuvent être adaptées à la molécule choisie,

ainsi qu'au type de surface. Nous avons étudié trois types de molécules : streptavidine, dendrimère, ADN, chacune pour des raisons différentes. La streptavidine, comme expliqué précédemment, a servi de molécule liante aux peptides pour le criblage pharmaceutique. Les dendrimères ont été étudiés, dans une première version, pour l'immobilisation de l'ADN (structuration des dendrimères sur une surface puis incubation des brins). Enfin, le dépôt d'ADN sera présenté dans la troisième partie.

II-4-1 : Streptavidine

La streptavidine a été déposée en réseau de lignes parallèles sur la surface fonctionnalisée époxyde. C'est grâce à la lithographie douce que j'ai pu structurer la surface avec ces protéines. Le protocole de dépôt par μ CP de la streptavidine est le suivant : le timbre en PDMS, formé comme expliqué précédemment (II-2), a d'abord été incubé pendant deux minutes, séché rapidement sous flux d'azote, puis amené en contact pendant 2 minutes avec la surface (sans pression). Un résultat typique peut être observé sur la figure 2.42.

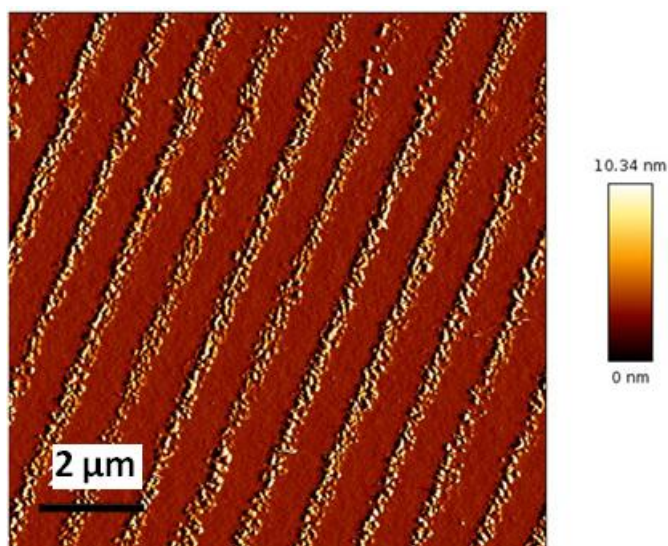


Figure 2.42 : Image AFM d'un dépôt de streptavidine réalisé par μ CP.

Les réseaux de streptavidine sont des lignes de 500 nm au pas de 1 μm. Ces motifs, sont les mêmes que ceux se trouvant sur le timbre. Pour des raisons pratiques, expliquées au chapitre suivant, les réseaux devaient être des lignes de 500 nm au pas de 1 μm avec la plus faible épaisseur possible, afin de trouver un compromis entre une haute sensibilité et une grande puissance de signal diffracté. Sur l'image, nous pouvons voir que les lignes du réseau sont constituées de petits amas de quelques dizaines de nanomètres

. Cette épaisseur correspond à 1 à 2 couches de streptavidine. Grâce au μ CP, il a donc été possible de déposer sur une surface, à l'échelle nanométrique jusqu'à une mono couche structurée de protéine.

Le dépôt de streptavidine par μ CP est à la fois simple et rapide. Il permet de déposer des monocouches de molécules selon le motif souhaité (ici des réseaux de lignes parallèles). C'est exactement ce que l'on cherche à obtenir afin de faciliter la liaison des peptides mais aussi afin de permettre une intensité de signal de diffraction correcte ainsi qu'une variation de cette intensité assez importante pour être détectée et interprétée sans erreur.

La lithographie douce a aussi été utilisée pour déposer d'autres molécules étudiées : les dendrimères.

II-4-2 : Dendrimères

Comme expliqué précédemment, les dendrimères sont des macromolécules très utilisées dans le domaine des nanotechnologies. Leur architecture et surtout le contrôle de leur taille et de leurs terminaisons permettent de les lier à de nombreuses molécules différentes, ce qui les rend très attractives pour constituer des chimies de surface versatiles⁴¹⁻⁴³. Les dendrimères dont nous avons déjà parlés, ceux utilisés pour les dendrilames, possèdent des terminaisons aldéhydes (CHO). Ceux qui ont été étudiés et qui seront présentés durant cette section possèdent des terminaisons amines (NH_2). Ce sont des dendrimères polyamidoamine (PAMAM). Notre choix s'est porté sur ces dendrimères car, en plus d'être les plus communs, ce sont ceux qui ont la structure la mieux connue⁵². La grande majorité des dépôts ont été réalisés sur des lames de verre fonctionnalisée époxyde du commerce. Comme expliqué précédemment (II-3-2), les groupements de type époxyde ont une affinité particulière avec les terminaisons amines, permettant à ces dernières de se lier de manière covalente aux groupements époxyde⁴⁸⁻⁴⁹.

Ces dendrimères étant hydrophiles, l'encrage de timbres en PDMS non traité (hydrophobe) avec ces molécules, bien que réalisable, s'est avéré plus difficile qu'avec un timbre hydrophile. Afin de simplifier l'encrage, des timbres ont été traités au plasma oxygène, ce qui a eu pour effet de les rendre hydrophiles (II-2). Deux types de timbres ont été utilisés durant ces expériences. Chacun avait pour motif un réseau de lignes parallèles au pas de 1 μm , mais la largeur des lignes variait de 200 nm à 800 nm. Les timbres ayant des lignes de

largeur 200nm au pas de 1 μ m seront appelés « Creux ». Les timbres ayant des lignes de largeur 800 nm au pas de 1 μ m seront appelés « Bosse ». Un schéma des timbres utilisés est observable sur la figure 2.43.

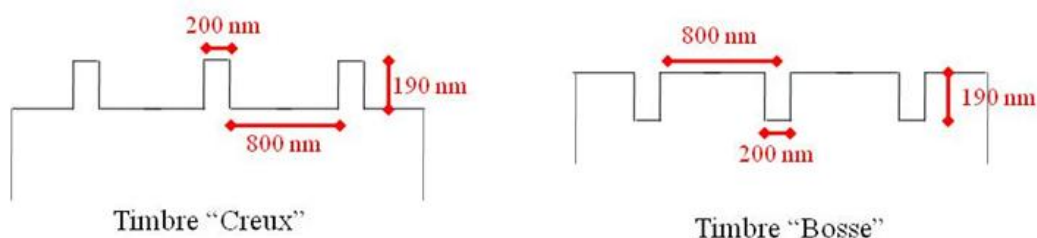


Figure 2.43 : Représentation schématique des timbres « Creux » et « Bosse » utilisés dans cette section.

Nous allons à présent voir les deux types d’expériences réalisées puis les résultats obtenus, très différents selon qu’il s’agisse d’un timbre traité ou non traité par le plasma.

II-4-2-a : Timbre hydrophobe

Cette première série de tests a été réalisée avec un timbre en PDMS n’ayant reçu aucun traitement. Les dendrimères PAMAM ont été dilués à différentes concentrations (de 700 à 0.7 nanomolaire) dans de l’éthanol. Pour cette série, le timbre a simplement été encre avec la solution pendant deux minutes, séché rapidement sous flux d’azote, puis déposé deux minutes sur la surface sans aucune pression. Les deux types de timbre (« Creux » et « Bosse ») ont été utilisés dans cette expérience. Le résultat d’un dépôt réalisé avec le timbre « Bosse » peut être observé sur la figure 2.44.

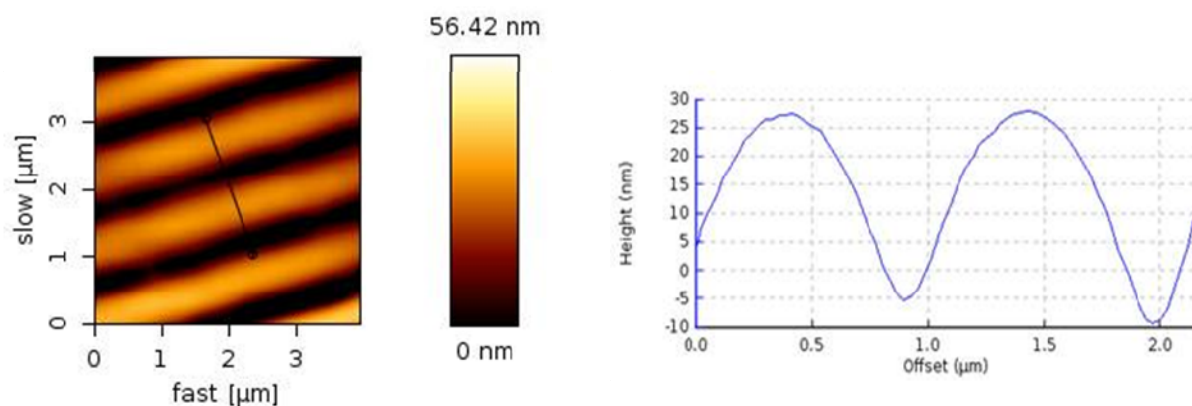


Figure 2.44 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 70 \text{ nM}$) réalisé par μCP . (Timbre « Bosse » (lignes de 800 nm de large au pas de 1 μm) non traité)

En regardant la vue en coupe de cette image, il apparaît que la largeur des lignes est de 800 nm, tout comme les motifs du timbre. Nous sommes ici dans un cas de μCP , c'est-à-dire que les motifs saillants du timbre sont reproduits à l'identique sur la surface. La hauteur des lignes est de 40 nm ce qui correspond à 7 couches de dendrimères. Le nombre important de couches peut être expliqué par la concentration importante de la solution utilisée pour ce procédé, soit 70 nM et par le temps de dépôt. Cette épaisseur reste cependant petite devant la profondeur des motifs topographiques du timbre : 190 nm.

D'autres expériences ont été réalisées en utilisant les timbres « Creux ». Les mêmes manipulations d'encre et de dépôt ont été utilisées dans ce cas. Le résultat peut être observé sur la figure 2.45.

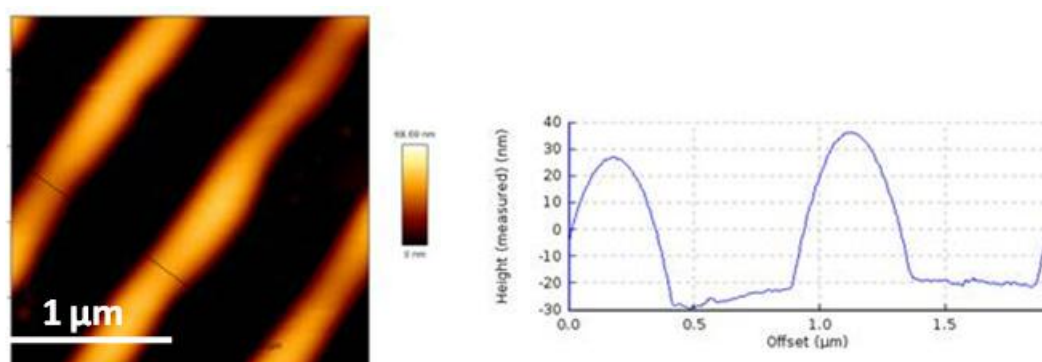


Figure 2.45 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 70 \text{ nM}$) réalisé par μCP . (Timbre « Creux » (lignes de 200 nm de large au pas de 1 μm) non traité)

La figure 2.45 est une image AFM en mode contact d'un réseau de dendrimères PAMAM réalisé par lithographie douce. La largeur des lignes est de 200nm au pas de 1 μ m, tout comme les motifs du timbre, nous sommes encore ici dans un cas de μ CP. La hauteur des lignes (60nm) peut aussi être expliquée par la forte concentration de dendrimères, 70 nM, ainsi que par le temps de dépôt.

Ainsi, plusieurs expériences ont été menées avec des timbres hydrophobes (non traités), avec différentes concentrations (de 0.7 à 700 nM) et sur différentes surfaces (verre ou verre fonctionnalisé époxyde). Tous les résultats obtenus concordent avec les deux présentés ci-dessus. A chaque fois, nous obtenons sur la surface un dépôt de dendrimères correspondant aux protusions du timbre, soit un cas de μ CP. Le nombre de couches (donc la hauteur des lignes) varie légèrement selon la concentration : l'épaisseur sera plus faible pour une concentration très basse (35 nm) et légèrement plus grande (60-70 nm) pour une très haute (solution mère).

Il est possible de conclure de ces séries d'expériences que les dendrimères n'opèrent pas de modifications sur le timbre et que le solvant dans lequel elles sont diluées (l'éthanol dans ce cas ci) n'agit pas non plus sur le PDMS. En effet, les molécules sont immobilisées sur le substrat selon les motifs des protubérances du timbre, ce qui correspond à un dépôt par μ CP. Dans certains cas, le dépôt peut être inversé (I-1-2-b), c'est ce qu'on appelle le micro transfert molding (μ Tm). Les molécules incubées sur le timbre sont déposées sur la surface selon l'inverse des motifs protubérants du timbre, ce qui correspond à un dépôt selon les creux du timbre. Ce cas peut se produire lorsque le solvant des molécules agit sur le timbre en le « gonflant », ce qui entraîne une migration des molécules dans le fond des motifs. De plus, un phénomène de capillarité entraîne les molécules placées sur les protubérances du timbre dans le fond des motifs. Cependant, dans les cas présentés ci-dessus, les molécules restent sur les protubérances du timbre, se déposant donc selon ces motifs (μ CP).

Comme expliqué en début de paragraphe, afin de simplifier l'encrage, certains timbres ont été traités au plasma oxygène. La goutte de solution de dendrimères s'étalant mieux lorsque le timbre est hydrophile.

II-4-2-b : Timbre hydrophile

Les deux types de timbre (« Creux » et « Bosse ») ont aussi été utilisés dans ces expériences. Le traitement au plasma oxygène a été court et de faible puissance. En effet, une puissance de 200W durant 20 secondes a été suffisante pour rendre complètement hydrophiles les timbres en PDMS. Pour confirmer l'action de ce traitement, un test de mouillage a été réalisé après le traitement plasma. Un angle de contact, entre une goutte d'eau et la surface en PDMS, de 37° a été mesuré après traitement plasma, contre 110° sans traitement. Un tel angle confirme l'hydrophilicité totale du timbre.

De suite après le traitement, les timbres ont été encrés avec une solution de dendrimères. Le traitement plasma a un effet court dans le temps. La grande mobilité des chaînes de polymère du PDMS⁵ a pour effet de pouvoir le rendre hydrophile avec des traitements très simples, mais elle entraîne aussi une rétraction du phénomène, soit un retour à la normale, très rapide, c'est pourquoi les timbres ont été encrés juste après le traitement, afin de ne pas perdre l'hydrophilicité de la surface. Le résultat d'une de ces expériences réalisées avec un timbre « Bosse » peut être observé sur la figure 2.46.

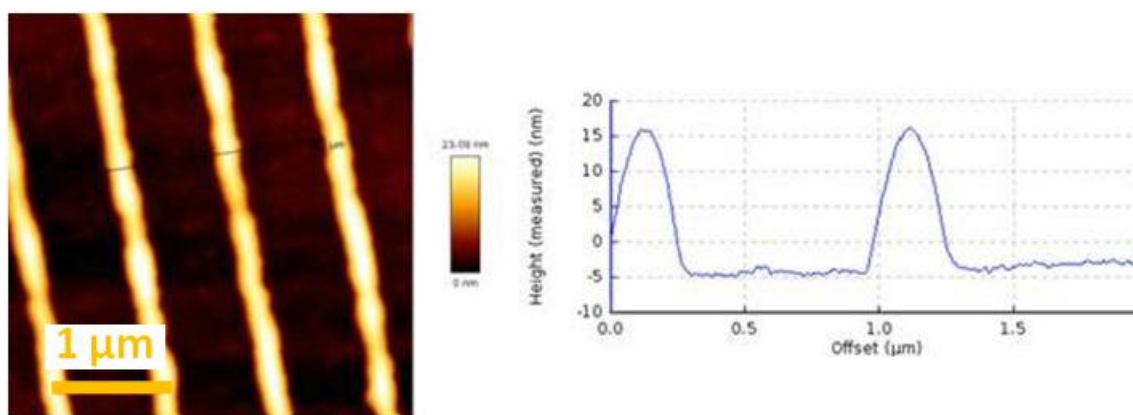


Figure 2.46 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères ($[C] = 70 \text{ nM}$) réalisé par lithographie douce avec un timbre « Bosse » (lignes de 800 nm de large au pas de 1 μm) en PDMS traité au plasma oxygène.

La figure 2.46 est une image AFM, réalisée en mode contact, d'un réseau de dendrimères. Le timbre utilisé avait des lignes de 800 nm au pas de 1 μm (timbre « Bosse »). La première chose qu'il est possible de constater est que la largeur des lignes est de seulement 200 nm, soit l'inverse des motifs protubérants, c'est-à-dire une taille correspondant à la

dimension des cavités du timbre. Nous ne nous trouvons donc pas dans un cas de μCP . Au vu du résultat, opposé aux premiers obtenus, d'autres expériences ont été réalisées afin de mieux comprendre le procédé ayant lieu lors du transfert. Dans le but d'être dans les mêmes conditions, mais de voir si le processus d'inversement des motifs était valable dans tous les cas, le même traitement plasma a été gardé, tout en changeant de timbre. La figure 2.47 est une image AFM d'un dépôt de dendrimères réalisé avec un timbre « Creux » traité par plasma oxygène.

Dans ce cas ci, les lignes de dendrimères déposées par lithographie douce avec le timbre « Creux » traité ont une largeur de 800 nm, ce qui représente un dépôt réalisé selon l'inverse des motifs saillants du timbre. Nous sommes donc, ici aussi, dans un cas de lithographie douce autre que le μCP . Il est donc possible de dire que le traitement plasma agit sur le PDMS. En effet, la nature du phénomène d'impression est complètement changée, ce qui implique une modification drastique des phénomènes d'encrage et de contact.

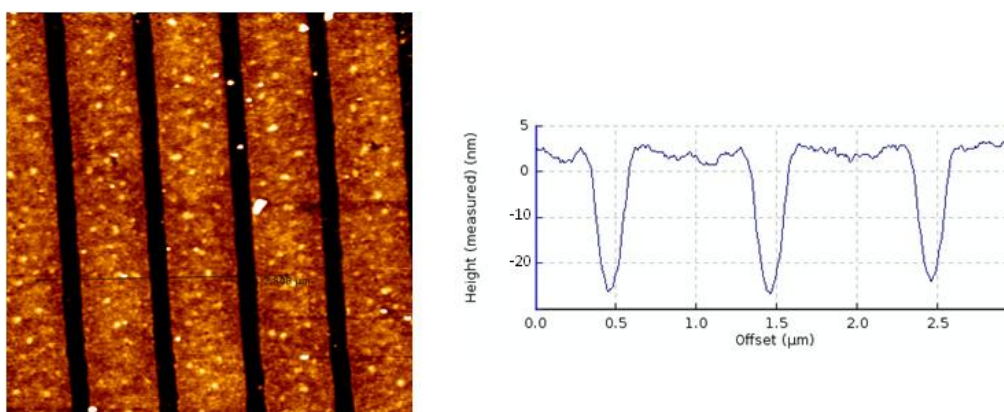


Figure 2.47 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères ($[C] = 70 \text{ nM}$) réalisé par lithographie douce avec un timbre « Creux » (lignes de 200 nm de large au pas de 1 μm) en PDMS traité au plasma oxygène. Les lignes de dendrimères déposées ont une largeur de 800 nm pour une hauteur de 25 nm.

Afin d'approfondir les explications et d'analyser le phénomène, de nombreux autres tests ont été réalisés. Pour étudier l'influence des différents paramètres pouvant agir sur le timbre lors du dépôt par lithographie douce, plusieurs expériences ont été menées en changeant à tour de rôle :

- la concentration de la solution de dendrimères,
- le solvant (remplacement de l'éthanol par de l'eau),
- la surface (lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde remplacée par du verre non traité),
- la molécule (tests fait avec des Polymères à empreintes moléculaires (MIP)).

Les variations des différents paramètres comme le solvant, la surface et la molécule ont toujours donné le même genre de résultats : un dépôt inversé par rapport aux motifs du timbre lorsque que celui-ci était traité au plasma oxygène. Cependant, par soucis de concision, ne seront présentés ici que les résultats réalisés sur la variation de la concentration.

Nous avons donc fait varier la concentration de $[C] = 700 \text{ nM}$ ($[C]$ de la solution mère) à $[C] = 0.7 \text{ nM}$ avec pour solvant l'éthanol.

Les timbres « Creux » et « Bosse » ont été traités au plasma oxygène de la même manière que précédemment (200 W pendant 20 secondes). Le résultat d'une des expériences réalisées avec une concentration élevée et un timbre « Creux » traité au plasma oxygène, peut être observé sur la figure 2.48.

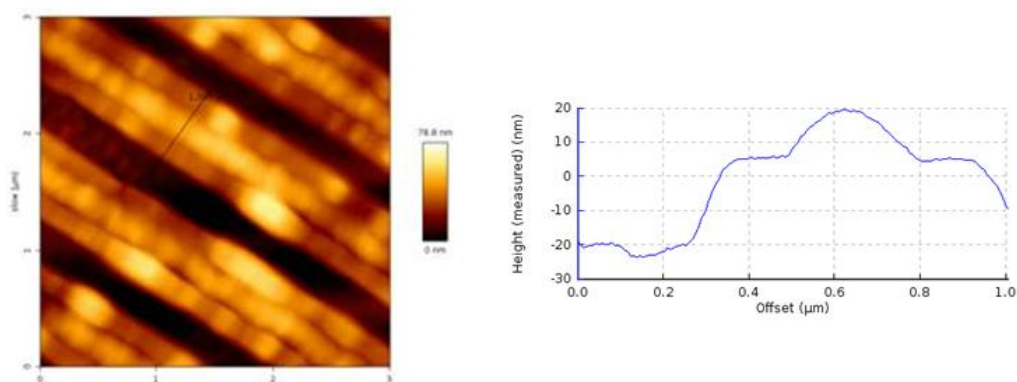


Figure 2.48 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères réalisé par lithographie douce avec un timbre « Creux » (lignes de 200 nm de large au pas de 1 μm) traité au plasma oxygène, avec une concentration de solution de 700 nM.

Les dendrimères ont été déposés, ici aussi, suivant l'inverse des motifs du timbre, car la largeur mesurée sur le dépôt est de 800 nm contrairement aux motifs protubérants du timbre « Creux » qui ont une largeur de 200 nm. Lorsque nous regardons la coupe de la ligne, nous pouvons observer une bosse centrale haute de plus de 40 nm.

En comparant avec la figure 2.47 qui utilisait une solution 10 fois moins concentrée, on peut s'apercevoir que les lignes sont plus épaisses dans le cas de la figure 2.48 (25 nm pour la figure 2.47 contre 40 nm pour la figure 2.48). En effet, lorsque la concentration de l'encre est élevée, il y a augmentation de la quantité de dendrimères adsorbés sur le timbre et donc épaisseur des dépôts.

Des tests avec des concentrations faibles ont aussi été réalisés. Nous avons donc réalisé la même expérience (timbre « Creux », même traitement), mais avec une concentration faible : 0.7 nM. Le résultat de cette expérience peut être observé sur la figure 2.49.

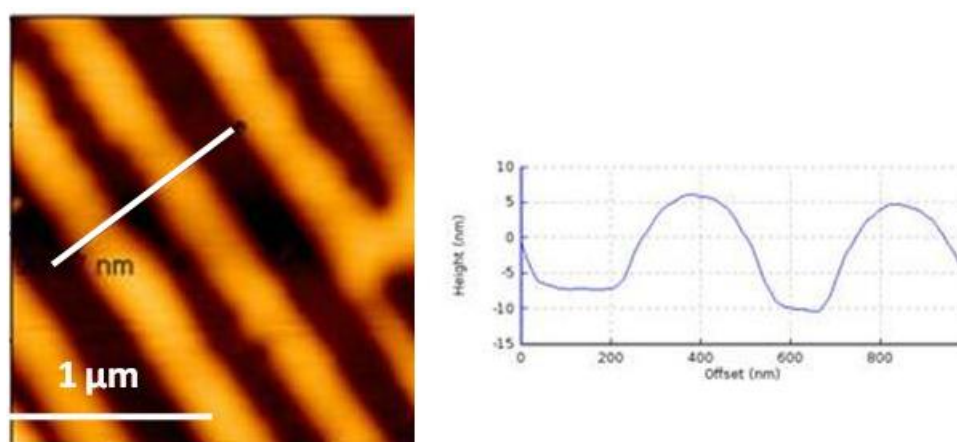


Figure 2.49 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères réalisé par lithographie douce avec un timbre « Creux » (lignes de 200 nm de large au pas de 1 μm) traité au plasma oxygène et une concentration de solution de 0.7 nM.

La figure 2.49 est un dépôt de dendrimères réalisé par lithographie douce à l'aide d'un timbre en PDMS structuré et traité au plasma oxygène. Le motif se trouvant sur le timbre était un réseau de lignes parallèles larges de 200 nm au pas de 1 μm (timbre « Creux »). Le dépôt obtenu n'est ni un réseau de lignes de 200 nm au pas de 1 μm (résultat obtenu par μCP), ni un réseau de lignes de 800 nm au pas de 1 μm (résultat obtenu avec un timbre traité). Les lignes de dendrimères ont pour largeur 350 nm et pour hauteur 12 nm, ce qui équivaut à 1 à 2 couches de dendrimères. La hauteur est donc nettement inférieure à celle obtenue lors des dépôts réalisés avec une concentration plus élevée (Fig. 2.48 et 2.47). Nous trouvons ici un phénomène inverse à celui que nous avons vu tout à l'heure (concentration élevée : épaisseur plus grande) mais concordant : une concentration plus faible ne permet pas l'adsorption sur le timbre d'une grande quantité de dendrimères et donc engendre un dépôt d'une plus faible

épaisseur. En regardant plus attentivement la coupe, nous pouvons voir que la réunification de deux lignes de dendrimères, et du substrat (noir) placé entre elles, a, au final, une largeur de 800 nm, ce qui correspond à la largeur des cavités du timbre. La ligne adjacente, correspondant aussi au substrat et ayant une largeur de 200 nm, complète la période des motifs. L'ensemble correspond alors au pas prédéfini de 1 μm .

Interprétation :

Nous pouvons à présent, à l'aide des différents résultats expérimentaux que nous avons obtenus, proposer une explication sur les phénomènes ayant lieu lors de l'encrage et lors de l'impression, dans le cas où la structuration a eu lieu avec un timbre traité au plasma O_2 . La première idée était que le dépôt se faisait par μTm , c'est-à-dire selon l'inverse des motifs saillants du timbre. En effet, sur les figures 2.46 et 2.47, les dendrimères ont été déposés selon l'inverse des motifs protubérants du timbre, il pourrait donc s'agir, à première vue, d'un cas de μTm (chapitre I). Cependant, les images AFM 2.48 et 2.49 ne représentent pas un dépôt réalisé par μTm . En effet, avec une concentration élevée, comme c'était le cas de la solution de la figure 2.48, nous aurions dû obtenir une épaisseur importante de dendrimères mais constante⁵³. La bosse au milieu de la ligne sur la figure 2.48, et les lignes de 350 nm de largeur sur la figure 2.49 montre qu'il y a ici un mélange de plusieurs méthodes de dépôt par lithographie douce : le μTm , qui a pour effet de déposer les dendrimères selon les motifs creux du timbre et un phénomène qui aurait pour effet de « chasser » les dendrimères sur le côté des protubérances du timbre.

Un schéma représentant le phénomène lors du dépôt, pour le cas d'une concentration élevée, est représenté sur la figure 2.50.

Lors du traitement plasma, il y a deux facteurs qui doivent être pris en compte. Le premier est que le traitement plasma modifie la chimie en surface du timbre en PDMS, créant une fine couche d'oxyde de silicium, permettant à la solution de dendrimères de s'étaler sans peine sur le timbre et donc d'atteindre plus facilement le fond des motifs. Le second effet est que le PDMS, après traitement, a une interaction avec la surface beaucoup plus importante que lorsqu'il était non traité. En effet, plusieurs études antérieures ont prouvé que l'adhésion du PDMS sur certaines surfaces (verre ou fonctionnalisées époxyde par exemple) était beaucoup plus forte après un traitement plasma^{29-31,54}. L'interaction étant beaucoup plus forte entre le PDMS hydrophile et les surfaces de verre ou les surfaces fonctionnalisées époxyde hydrophiles aussi, le timbre se retrouve presque collé sur la surface. Au final, lors du dépôt,

les protubérances du timbre se collent sur la lame, ce qui a pour effet de pousser sur le côté les dendrimères présents sur ces mêmes protubérances (Fig. 2.50 et 2.51). Le phénomène est très proche d'un moulage du film de dendrimères par le timbre, moulage provoqué par la très forte adhésion du timbre sur la surface.

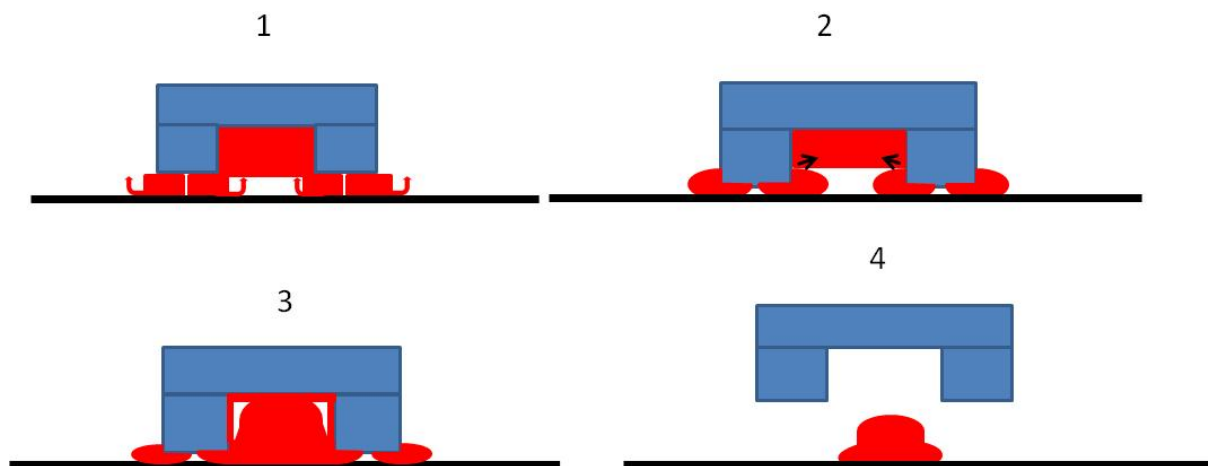


Figure 2.50 : *Représentation schématique du phénomène se produisant lors du dépôt de dendrimères à très haute concentration avec un timbre « Creux » traité au plasma oxygène. Lors de l'étape 2, les protubérances du timbre se retrouvent coller au substrat à cause de l'adhésion importante engendrée par le traitement plasma. Les dendrimères sur ces protubérances se retrouvent chasser sur les côtés.*

Dans le cas d'un timbre traité et d'une concentration élevée (700 nM), la facilité d'encrage due à l'hydrophilicité du timbre, permet aux dendrimères de se répandre partout, y compris dans le fond des motifs creux du timbre, ce qui, associé à la forte concentration crée une accumulation de dendrimères dans le fond des motifs (étape 1 de la figure 2.50). Lorsque le timbre est déposé sur la surface, les molécules présentes sur les lignes sont chassées sur les cotés, à l'extérieur, mais aussi à l'intérieur de la cavité créant un agglomérat de dendrimères dû à la trop forte concentration. Les dendrimères s'accumulent les uns sur les autres donnant ainsi une bosse centrale.

L'interprétation que nous venons de voir de la technique de structuration des dendrimères, est corrélée par le dépôt de la figure 2.49 réalisé avec une concentration faible. En effet, dans le cas d'un timbre traité et d'une concentration faible (0,7 nM), peu de dendrimères vont s'accumuler dans les creux du timbre en PDMS. Il en est de même, pour ceux placés sur les protubérances, les dendrimères s'y trouveront en faible quantité. Lors du

contact, les protubérances du timbre vont se coller à la surface, poussant les dendrimères sur les cotés extérieurs et intérieurs des protubérances (étapes 1 et 2 de la figure 2.51). La faible concentration ayant empêchée une accumulation dans les creux, les dendrimères ne peuvent pas s'empiler les uns sur les autres, créant ainsi un réseau de lignes par dépôt sur les bords des lignes (étape 4 de la figure 2.51).

Le phénomène, qui a lieu lors du dépôt avec un timbre traité et une faible concentration (0,7 nM), est schématisé sur la figure 2.51.

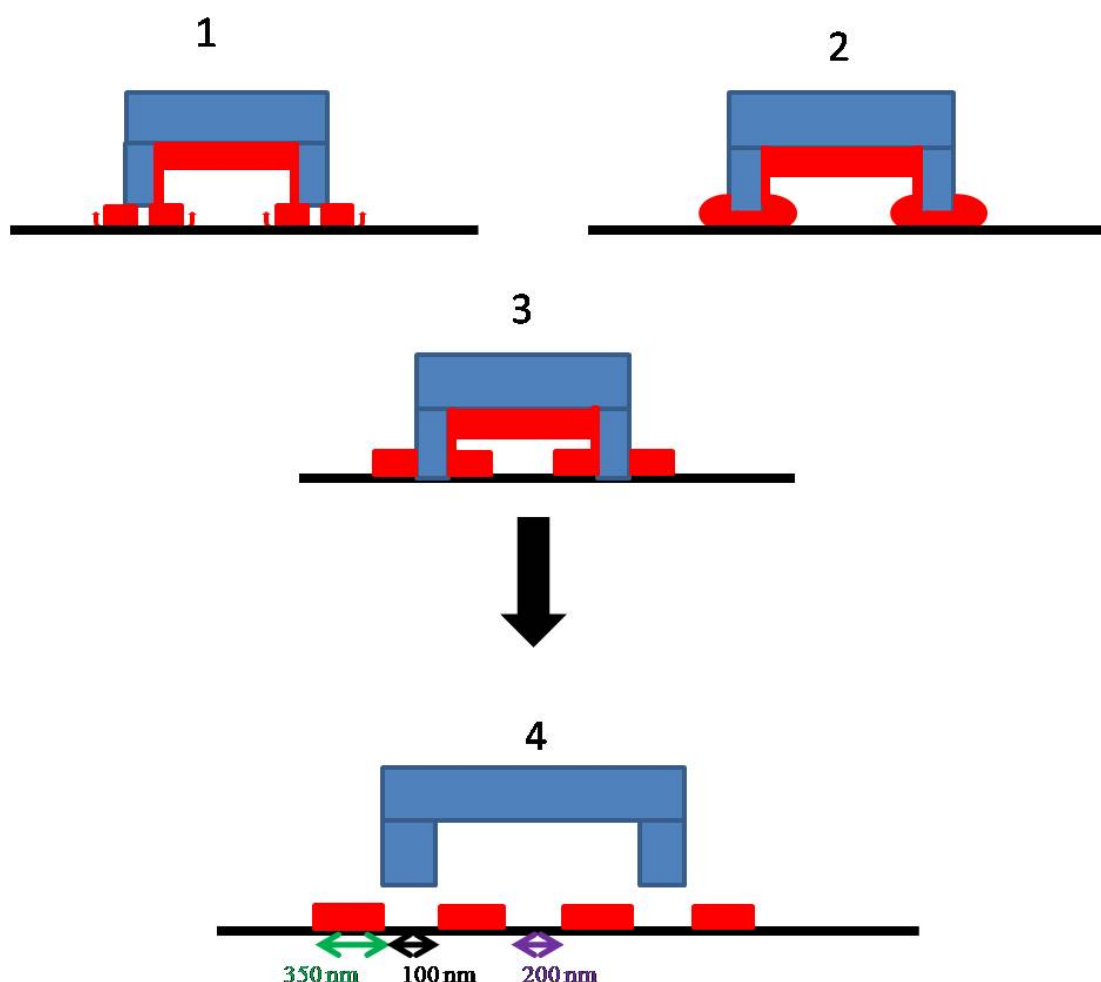


Figure 2.51 : Représentation schématique du phénomène se produisant lors du dépôt de dendrimères à faible concentration avec un timbre « Creux » traité au plasma oxygène.

Lors de ces expériences, nous avons fait varier de nombreux paramètres qui pouvaient tous influencer le dépôt des dendrimères. Le changement de substrat, de solution, de solvant, de molécule et même de concentration ont tous donné des dépôts concordants. En effet, dans

chaque cas, les mêmes types dépôts ont été observés : dépôt selon le μ CP avec un timbre non traité, dépôt selon un phénomène de moulage avec un timbre traité. Il est donc possible, avec un seul timbre, de déposer des molécules de deux manières différentes en le traitant ou non par plasma O_2 avant l'impression. Cette propriété présente donc un intérêt car elle permet d'avoir deux structurations différentes (opposées) d'un substrat avec un seul timbre donc un seul moule. En effet, pour déposer des lignes de 200 nm ou de 800 nm avec les molécules choisies, il faudrait d'abord fabriquer deux moules différents par e-beam. Grâce à aux propriétés hydrophobes/hydrophiles du PDMS, avec un seul moule, il est possible de déposer la même molécule selon deux motifs inversés, avec un simple traitement plasma.

Le traitement infligé au PDMS est donc extrêmement important. En modifiant la surface du PDMS, nous modifions son comportement tant au niveau de l'encrage que du dépôt. Ces deux étapes étant très importantes, voire cruciales, il est nécessaire de faire attention au traitement choisi pour le PDMS, puisqu'il influence de nombreux paramètres.

Nous avons vu le dépôt de deux types de molécules, et les améliorations potentiellement réalisables qui permettraient de déposer la même molécule selon deux motifs submicroniques différents, mais avec le même timbre, et donc le même moule. Nous allons, dans la suite, présenter le dépôt de brins d'ADN qui ont servi pour l'étude du banc de diffraction (III-3-2). Il s'est avéré dans ce cas là, plus pratique pour la détection d'avoir une couche uniforme de dendrimères (dendrilame II-3-1) sur laquelle il serait aisé de structurer par lithographie douce des réseaux diffractifs de molécules sondes d'ADN.

II-4-3 : ADN

Dans le but de fabriquer des réseaux de lignes parallèles d'ADN, nous avons utilisé des dendrilames (II-3-1). Ces lames sont en effet, comme expliqué précédemment, conçues pour accueillir des brins d'ADN terminaisons amines. Nous avons utilisé des timbres ayant des réseaux de lignes parallèles larges de 500 nm au pas de 1 μ m. Le protocole pour déposer par lithographie douce des brins d'ADN est le suivant : 1 min d'incubation de la solution contenant l'ADN sur le timbre, séchage rapide sous flux d'azote puis dépôt du timbre sur la dendrilame pendant 1 minute. Les solutions d'ADN utilisées ont toutes été fournies par la plateforme biopuce de l'INSA Toulouse. Le résultat d'un dépôt peut être observé sur la figure 2.37. Les oligonucléotides utilisés ici possèdent approximativement 60-mer.

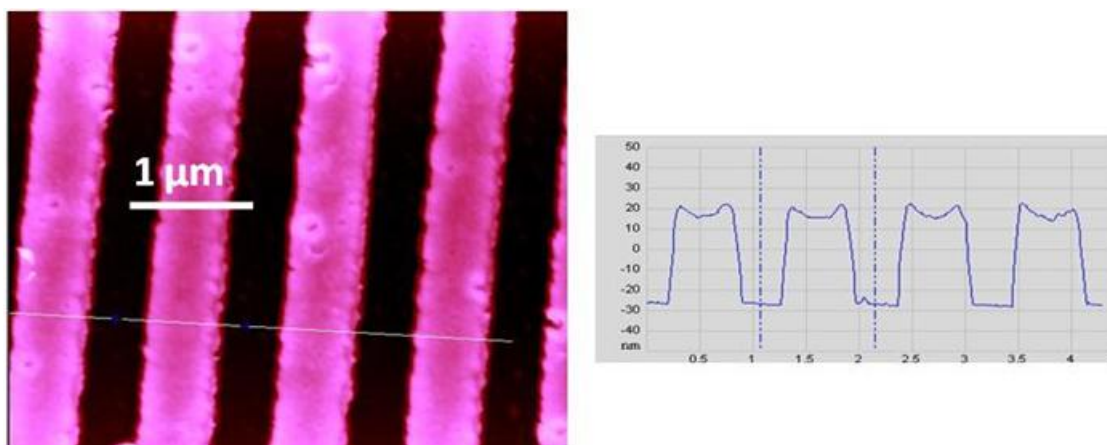


Figure 2.37 : Image AFM et coupe d'un dépôt d'ADN sur une dendrilame réalisé par lithographie douce ($[C] = 5\mu M$).

Les réseaux d'ADN obtenus par lithographie douce, sont des lignes de 500 nm au pas de 1 μm , tout comme les motifs du timbre. La hauteur des lignes d'ADN, observable sur la coupe, est de 50 nm.

L'épaisseur des lignes déposées ici est importante, cependant cette hauteur peut potentiellement varier avec différents paramètres : concentration de la solution (une concentration trop importante change le dépôt par μCP en dépôt par μTm), longueur des oligonucléotides, temps d'encrage⁵⁵. 30 secondes pour l'étape d'encrage aurait été suffisante pour obtenir un réseau de lignes de 500 nm de large au pas de 1 μm , mais avec une épaisseur de lignes plus faible.

Nous pouvons remarquer sur la coupe que le sommet des lignes structurées sur le substrat est « creux ». Après plusieurs tests, il s'est avéré que tous les dépôts d'ADN par μCP avaient cette particularité.

II-5 : Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons vu différentes techniques de dépôts utilisées durant ces travaux de thèse. Ces techniques, adaptées aux molécules que nous souhaitons déposer, sont simples et rapides. Le PDMS, matériau employé pour les timbres, est peu coûteux et

adapté à ce type de dépôt. Ces propriétés physico-chimiques lui donne des avantages de flexibilité tant physique (le PDMS s'adapte à des formes nanométriques avec une reproduction exacte et peut être utilisé sur des surfaces non planes) que chimique (il est hydrophobe mais peut être modifié hydrophile). Cette flexibilité permet de fabriquer des timbres comme le macrotimbre, permettant lui-même un dépôt multiple de molécules différentes en une fois avec un seul timbre, mais permet aussi, dans le cas des dendrimères, de faire deux structurations de support différentes avec un même motif sur un timbre. Bien que ce dernier avantage n'ait pas été vérifié pour un grand nombre de molécules, il a été testé, en plus des dendrimères, avec des MIP (chapitre IV).

Références

- 1: B Michel, A Bernard, A Bietsch, E Delamarche, M Geissler, D Juncker, H. Wolf *IBM J Res & Dev* **2001**, 45, 697.
- 2: B. Viallet, C. Martin, L. Ressler, J. Grisolia, J-P Peyrade *Silanes and Other Coupling Agents* **2006**, 4, 1.
- 3: S. K. Sia, G. M. Whitesides *Electrophoresis* **2003**, 24, 3563-3576.
- 4: J. Stein, L. N. Lewis, Y. Gao, R. A. Scott *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3693.
- 5 : J. E. Mark, H. R. Allok *Inorganic Polymers* **1992**, 141.
- 6: F. Garbassi, M. Morra, E. Occhiello *Polymer Surfaces: From Physics to Technology* **1994**, 427.
- 7 : F. J. Holly, M. J. Owen *Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces* **1981**, 2, 625.
- 8 : Q. He, Z. Liu, P. Xiao, R. Liang, N. He, Z. Lu *Langmuir* **2003**, 19, 6982.
- 9 : Y. Xia, G. M. Whitesides *Angew. Chem.* **1998**, 110, 568.
- 10 : R. S. Gorur, L. A. Johnson *Power Delivery, IEEE Transactions* **1991**, 6, 1366.
- 11 : J. L. Tan, J. Tien, C. S. Chen *Langmuir* **2002**, 18, 519.
- 12 : S. Zhao, F. Denes, S. Manolache, R. W. Carpick *SEM conference* **2002**.
- 13 : V. Roucoules, A. Ponche, A. Geissler, F. Siffer *Langmuir* **2007**, 23, 13136-13145.
- 14 : H. Hillborg, U. W. Gedde *IEE trans. Dielec. Elec. Insul.* **1999**, 6, 703.
- 15 : M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, D. Johnson *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, 137, 11-24.
- 16 : www.rsc.org
- 17 : A. Janshoff, Ma. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs *Angewandte Chemie* **2000**, 39, 3212-3237.
- 18 : M. L. Wallwork, D. A. Smith *Langmuir* **2001**, 17, 1126-1131.
- 19 : K. Kendall *Science* **1994**, 263, 1720-1725.
- 20 : H. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. Gaub *Adv. Mater.* **1998**, 3, 316.
- 21 : Graham, D. J.; Price, D. D.; Ratner, B. D. *Langmuir* **2002**, 18, 1518-1527.
- 22 : I. Bôhm, A. Lampert, M. Buck, F. Eisert, M. Grunze *Appl. Surf. Sci.* **1999**, 141, 237-243.
- 23 : K. Glasmästar, J. Gold, A. S. Andersson, D. S. Sutherland, B. Kasemo *Langmuir* **2003**, 19, 5475-5483.
- 24 : S. Al-Maawali, J. E. Bemis, B. B. Akhremitchev, R. Leecharoen, B. G. Janesko, G. C. Walker *J. of Phys. Chem. B* **2001**, 105, 3965-3971.
- 25 : G. J. Lake, A. G. Thomas *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1967**, 300, 108

- 26 : A. Geissler, M.-F. Vallat, L. Vidal, J.-C. Voegel, J. Hemmerlé *Langmuir* **2008**, 24, 4874-4880.
- 27 : C. Thibault, C. Séverac, A. F. Mingotaud, C. Vieu, M. Mauzac *Langmuir* **2007**, 23, 10706.
- 28 : H. Hillborg, J. F. Ankner, U. W. Gedde, G. D. Smith, H. K. Yasuda , K. Wikström *Polymer* **2000**, 41, 6851-6863.
- 29 : S. Bhattacharya, A. Datta, J. M. Berg, S. Gangopadhyay *J. Microelectromech. Syst.* **2005**, 14, 590-597.
- 30 : A. Y. N Hui, G. Wang, B. Lin, W. T. Chan *Lab Chip* **2005** 5 1173 1177
- 31 : M. K. Chaudhury, G. M. Whitesides *Science* **1992** 255 1230 1232
- 32 : C. Y. Hui, A. Jagota, Y. Y. Lin, E. J. Kramer *Langmuir* **2002**, 18, 1394.
- 33 : K. G. Sharp, G. S. Blackman, N. J. Glassmaker *Langmuir* **2004**, 20, 6430.
- 34 : Y. Y. Huang, W. Zhou, K. J. Hsia *Langmuir* **2005**, 21, 8058.
- 35 : E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel *Adv. Mater.* **1997**, 9, 741.
- 36 : K. G. Sharp, G. S. Blackman, N. J. Glassmaker *Langmuir* **2004**, 20, 6430-6438.
- 37 : A. Bietsch, B. Michel *J. Appl. Phys.* **2000**, 88, 4310.
- 38 : J. A. Rogers, K. E. Paul, G. M. Whitesides *J. Vac. Sci. Technol. B* **1998**, 16, 88.
- 39 : H. Lalo, J. C. Cau, C. Thibault, N. Marsaud *Microelec. Eng. Special issue MNE* **2008**.
- 40 : <http://www.pasteurlille.fr/fr/recherche/biopuces/GenomiqueTranscriptomique/>
- 41 : <http://userpage.fu-berlin.de/~bbruegge/Mitglieder/P1.htm>
- 42 : A. Manna, T. Imae, K. Aoi *Chem. Mater* 2001, 13, 1674
- 43: D. C. Tully, K. Wilder, J. M. J. Frechet *adv mater*, 1999, 11, 314
- 44: <http://www.cnrs.fr/Cnrspresse/n383a51.htm>
- 45 : V. Le Berre, E. Trevisol, A Dagkessamanskaia, S Sokol, AM Caminade, JP Majoral, B. Meunier, J. François *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 1.
- 46 : E. Trévisiol, J. Leclaire, G. Pratviel, A.-M. Caminade, J. M. François, J.-P. Majoral and B. Meunier, 2002, Patent, Fr 0205049.
- 47: P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme *Science* **1989**, 243, 85-88.
- 48: G. Boiteux, P. Dublineau, M. Feve, C. Mathieu, G. Seytre, G. Ulanski, *J. Polym Bull* **1993**, 30, 441.
- 49: M. F. Grenier-Loustalot, P. Grenier, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1984**, 22, 4011-4033.

- 50: C. Mateo, V. Grazú, B.C.C. Pessela, T. Montes, J.M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1593–1601.
- 51: J.C. Cau, **2008**. *Thèse d'université*, Université de Toulouse, LAAS-CNRS.
- 52: D. A. Tomalia, H. Baker *Macromolecules* **1986**, 19, 2466
- 53: C. Thibault, C. Severac, E. Trévisiol, C. Vieu *J. M.N.E.* **2006**, 01, 213.
- 54: B. Millare, M. Thomas, A. Ferreira, H. Xu, M. Holesinger *Langmuir* **2008**, 24, 13218-13224.
- 55 : C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François, C. Vieu *J. Nanobiotech* **2005**, 3:7.

Chapitre 3 : Diffraction

Nous avons présenté au chapitre précédent la fabrication des biopuces : support, molécules, chimie de surface etc. Nous allons à présent étudier la technique de détection d'interactions que nous avons choisie pour la biopuce : la diffraction. Comme expliqué au chapitre I, cette méthode de détection sans marquage, développée par différentes équipes depuis plus de 10 ans, a été retenue pour sa simplicité et ses potentialités. Ce chapitre sera divisé en trois parties : premièrement, un rappel sur le principe général de la diffraction (par transmission) puis un cas particulier dans lequel nous nous sommes placés (en réflexion). Nous verrons ensuite le montage optique et enfin la présentation des résultats obtenus. Les études et simulations réalisées pour trouver les paramètres optimums de la diffraction ont été réalisées par Jean-Christophe Cau. Durant ce chapitre, un résumé de toutes les modélisations qui ont été nécessaires à cette étude sera présenté. Cependant, il est possible de consulter la globalité des modélisations ainsi que les détails de calculs dans le mémoire de thèse de Jean-Christophe Cau¹.

III-1 : Rappel du principe de diffraction

Comme il a été présenté au chapitre I (I-4-2), la diffraction repose sur le principe du comportement de la lumière sur un réseau périodique : l'onde plane incidente est réfléchi (loi de Descartes $\theta_i = \theta_r$) et diffractée en différents faisceaux, les ordres de diffraction dépendant des angles. Il a été démontré par Tsay et al.² et Goh et al.^{3, 4} que l'utilisation de la diffraction pour détecter des interactions entre deux molécules, en temps réel, était possible. Il est d'ailleurs sorti de ces recherches des biocapteurs diffractifs⁵ proposés par la société Axela.

Notre choix, contrairement à la société Axela, s'est porté sur une étude statique des interactions (étude après interaction) plutôt que dynamique (étude en temps réel). Le but était en effet de valider le concept de détection d'interactions par diffraction en mode statique, afin de pouvoir développer cette technologie dans un mode biopuce alors que ces prédécesseurs l'ont plutôt orientée dans un mode biocapteur. A ce propos, un scanner optique capable de lire la biopuce avant et après l'interaction et de donner le résultat lié à cette interaction est en cours de développement. Pour cela, comme vu au chapitre II, nous avons réalisé un ensemble

de micro-réseaux de diffraction de période submicronique sur un substrat (Fig. 3.1). Chacun de ces réseaux est composé de biomolécules sondes différentes destinées à la détection d'une interaction spécifique A, B, C, D...

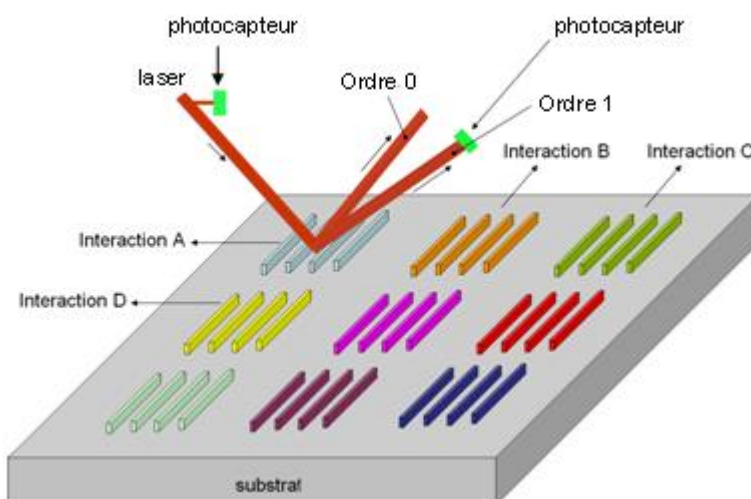


Figure 3.1 : Schéma de principe de diffraction d'après [1]

Le spectre de diffraction provient d'un phénomène d'interférence, générant une dispersion de lumière selon des directions distinctes appelées ordres, modulés par la diffraction. Ainsi, en mesurant les modifications du spectre de diffraction d'un faisceau laser incident, il est possible de savoir si une interaction a eu lieu et en connaître son type : spécifique ou non. Il est aussi possible de mesurer ces changements pour chaque réseau présent sur le substrat.

Afin d'adapter la technique de détection par diffraction au mode statique, certains paramètres ont dû être minutieusement choisis. En effet, des paramètres, tel que ceux du montage optique, sont préalablement fixés (longueur d'onde et angle d'incidence du laser), mais il faut aussi les paramètres optimums pour le réseau en lui-même : période, largeur, longueur et épaisseur des lignes. Comme vu au chapitre I, la période du réseau a été fixée à $1\mu\text{m}$ afin d'obtenir un ordre 1 bien séparé des autres ordres de diffraction ce qui facilitera la détection. Dans notre cas, nous travaillons à $\lambda = 633\text{ nm}$, ce qui, avec une incidence normale sur le substrat, donne un angle de diffraction de 40° .

Nous allons tout d'abord, dans la suite de cette partie, étudier la diffraction dans le cas le plus simple d'un réseau en transmission. Ceci nous permettra de poser les bases afin d'avoir une compréhension globale du phénomène, avant de se focaliser sur un cas particulier et plus complexe de diffraction. En effet, nous étudierons ensuite la diffraction dans un cas de réseau en réflexion (cas dans lequel nous nous plaçons).

III-1-1 : Diffraction d'un réseau en transmission

Plaçons nous tout d'abord dans le cas simple d'un réseau composé de N fentes, de largeur l et de période p . Cette étude nous permet de poser les bases du calcul d'un spectre de diffraction. En effet, lorsque la lumière de longueur d'onde λ traverse la fente de largeur l finie, elle est diffractée.

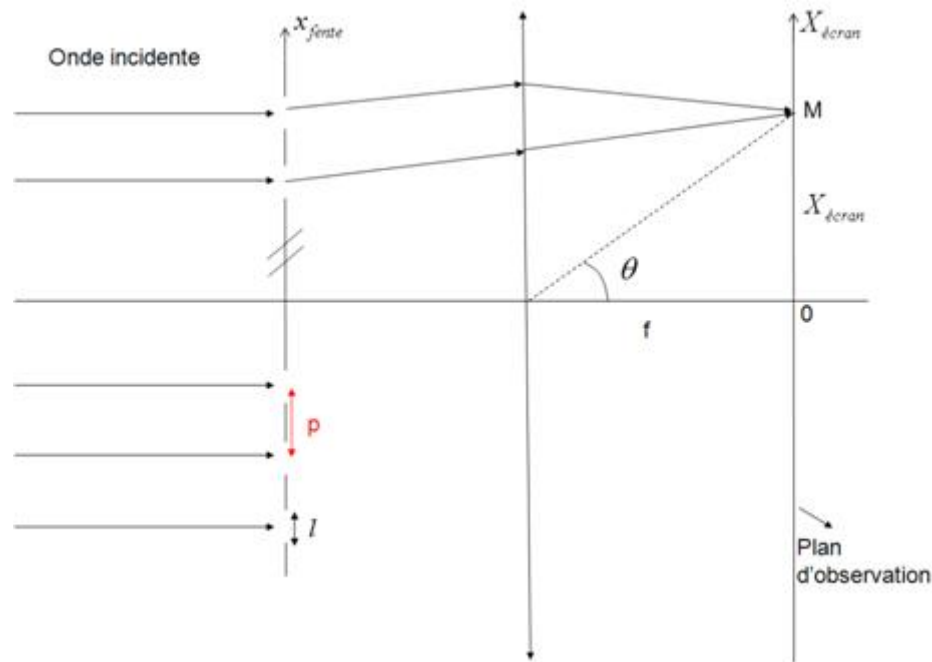


Figure 3.2 : Représentation schématique d'un réseau de N fentes. La figure de diffraction observable en M se trouve à l'infini (champ lointain), mais peut être observé à une distance finie f grâce à une lentille convergente

Nous appliquons dans ce cas le principe de Huygens-Fresnel qui sert, entre autres, à calculer la réponse d'un réseau de diffraction. Pour ceci, nous considérons que chaque fente équivaut à une source lumineuse dont chaque point émet une onde électromagnétique sphérique. Ces ondes sphériques, émises par les sources fictives, se propagent jusqu'au point M où elles vont interférer (les distances parcourues par les ondes étant différentes, elles sont

déphasées et donc interfèrent en M). Pour faciliter les calculs, nous nous plaçons en champ lointain : c'est l'approximation de Fraunhofer (M à l'infini). Dans ce cas, les ondes sphériques peuvent être considérées comme planes mais d'inclinaison différente. Aussi, une lentille convergente de distance focale f (Fig. 3.2) est utilisée afin d'obtenir la figure de diffraction dans le plan focal image, à une distance finie.

Dans l'étude du phénomène, il y a deux niveaux d'interférence : celui généré par la fente (diffraction par une seule fente), et celui généré entre les fentes (diffraction du réseau complet). Le calcul du spectre de diffraction d'un réseau va donc se décomposer en 3 étapes :

- 1- calcul de la diffraction par 1 fente, terme appelé diffraction.
- 2- calcul de la diffraction de l'ensemble des N fentes, terme appelé interférences.
- 3- Superposition des deux phénomènes de diffraction et d'interférence.

1- Pour calculer le terme de diffraction, il faut considérer qu'à l'infini, la diffraction provient de la somme continue des amplitudes a des ondes incidentes, émises par les divers points de la fente source et déphasées les unes par rapport aux autres. L'intensité lumineuse en M, point repéré par l'angle θ (Fig. 3.2), s'écrit :

$$I_{diff} = a^2 \frac{\sin^2 u}{u^2} \quad \text{avec} \quad u = \frac{\pi \times l \times \sin(\theta)}{\lambda} \quad (1)$$

2- Calculons à présent le terme d'interférence, qui est la somme d'ondes provenant des diverses fentes. Chaque onde émanant d'une fente est déphasée de ϕ par rapport à la fente centrale. Le déphasage s'exprime comme suit (avec les données du système) :

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \times p \times \sin(\theta) \quad (2)$$

Par extension de l'équation (1), l'intensité lumineuse des ondes provenant des N fentes en M s'écrit :

$$I_{\text{int}} = a^2 \frac{\sin^2(\frac{N\phi}{2})}{\sin^2(\frac{\phi}{2})} \quad (3)$$

3- Afin d'obtenir la simulation d'un cas réel, nous modulons le terme d'interférence par celui de diffraction, ce qui est rendu mathématiquement par la multiplication des deux termes (diffraction et interférence). On obtient alors l'intensité au point M d'un réseau réel de diffraction :

Terme de diffraction
Terme d'interférence

$$I = a^4 \frac{\sin^2 u}{u^2} \frac{\sin^2(\frac{N\phi}{2})}{\sin^2(\frac{\phi}{2})}$$

avec $u = \frac{\pi \times l \times \sin(\theta)}{\lambda}$ et $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \times p \times \sin(\theta)$

La figure 3.3 a) représente chaque terme séparément. Les pics (clairs) résultent de l'interférence (2) entre les différentes fentes tandis que l'enveloppe (noire) résulte de la diffraction de la lumière par une fente (1). L'intensité totale, résultante de la modulation des deux différents termes est représentée sur la figure 3.3 b). Du fait de cette modulation, les pics d'interférence excentrés sont éteints (ordre 2 et 3 sur la figure 3.3 b).

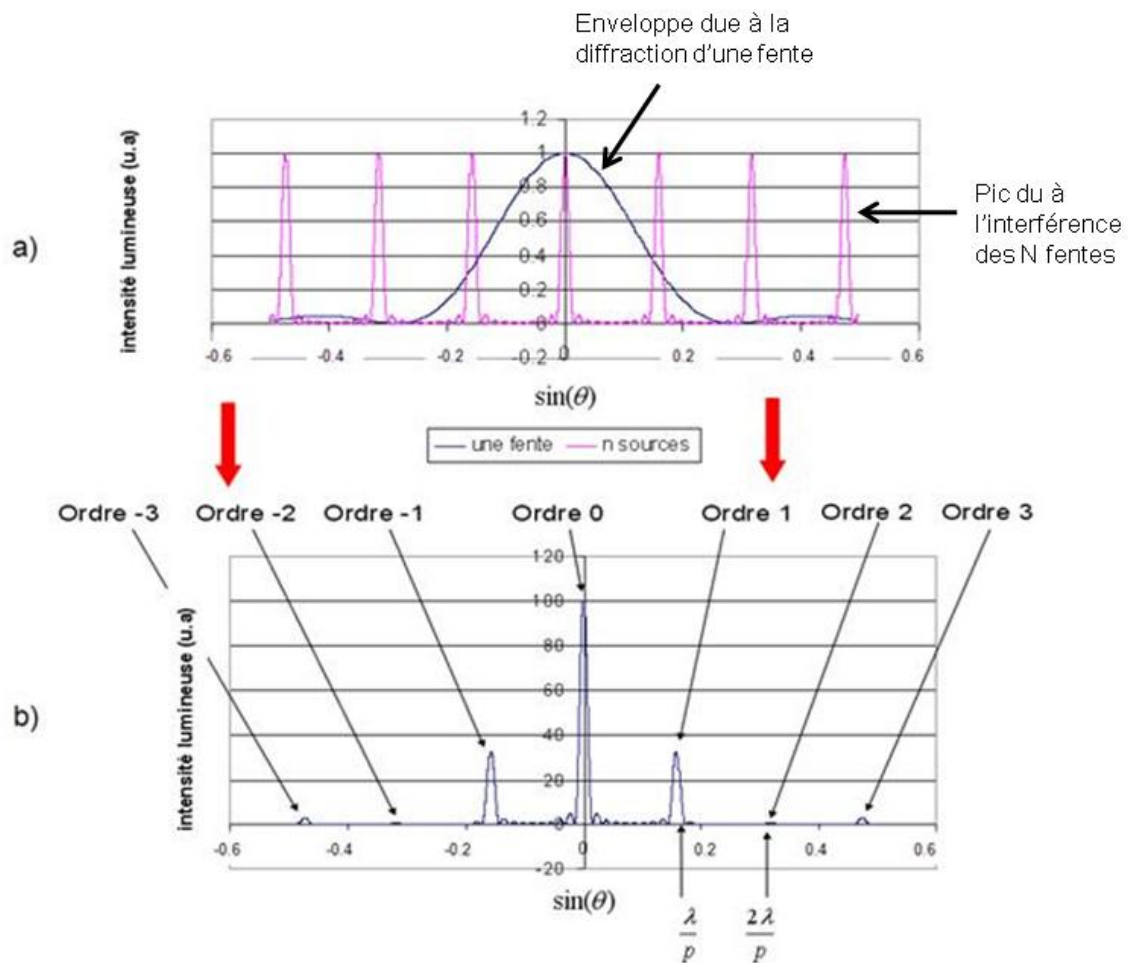


Figure 3.3 : d'après [1]. Répartition de l'intensité lumineuse d'un réseau en tenant compte des deux termes : interférence et diffraction.

- a. Superposition des phénomènes d'interférence et de diffraction
- b. Variation globale de l'intensité lumineuse observée au point M

En pratique, afin de satisfaire à la volonté de faire une biopuce « diffractante » bas coût, seuls deux photocapteurs sont utilisés pour mesurer les intensités lumineuses (Fig. 3.1). Chacun de ces photocapteurs intègre un signal différent. Comme vu au chapitre I (I-5-3), un des photocapteurs intègre l'ordre de diffraction 1, tandis que le deuxième mesure une partie du signal incident. Afin que le photocapteur collecte un maximum de la puissance diffractée reçue, il est dimensionné de manière à intégrer le lobe principal de l'intensité lumineuse associée à l'ordre 1 de diffraction. Au final en intégrant l'intensité lumineuse reçue sur tout le lobe, nous obtenons P_1 , la puissance reçue par le photocapteur se trouvant sur l'ordre 1 de diffraction. Afin de s'affranchir des fluctuations du laser incident, il est possible de construire

la grandeur « puissance relative » $\frac{P_1}{P_i}$, rapport entre la puissance diffractée et la puissance incidente.

Au final, chaque photodétecteur va mesurer une puissance reçue : P_1 pour l'ordre de diffraction 1, P_i pour le faisceau incident. L'interaction (si elle a eu lieu) se définit par le gain G , qui représente la variation relative de signal après interaction, variation indépendante des fluctuations du laser incident :

$$G = \frac{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{après}} - \left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{avant}}}{\left(\frac{P_1}{P_i}\right)_{\text{avant}}}$$

Nous venons de voir le principe de la diffraction par un réseau de N fentes en transmission. Bien que ce cas ne soit pas celui dans lequel nous nous sommes placés, il nous a permis de comprendre les phénomènes liés à la diffraction de la lumière par un réseau de fentes : le comportement physique (figure de diffraction), la traduction mathématique (intensité lumineuse), l'utilisation de ses intensités (photodétecteur) puis leur interprétation dans un but applicatif (mesure du gain G). En partant de ces bases, nous allons à présent voir la diffraction d'un réseau de N fentes en réflexion. Comme dit précédemment, pour plus d'informations sur les calculs contenus dans ces parties, le lecteur devra se référer au manuscrit de thèse de Jean-Christophe Cau.

III-1-2 : Diffraction d'un réseau en réflexion

Le cas d'un réseau en réflexion est plus complexe que pour un réseau en transmission. En effet, en réflexion, il faut tenir compte de la lumière émise par les fentes sources mais aussi de la lumière émise entre les fentes sources. Si on se place dans un cas de réseaux formés par des biomolécules, les fentes sources sont assimilées aux lignes du réseau, formées par les biomolécules, et les espaces entre les fentes sources sont assimilés à l'espace entre les lignes, soit aux « creux ». L'amplitude des ondes émises par chaque point est déphasée, par rapport à l'onde incidente, par les différences de chemins optiques (comme en transmission) mais aussi par la traversée des milieux et des interfaces (Fig. 3.4).

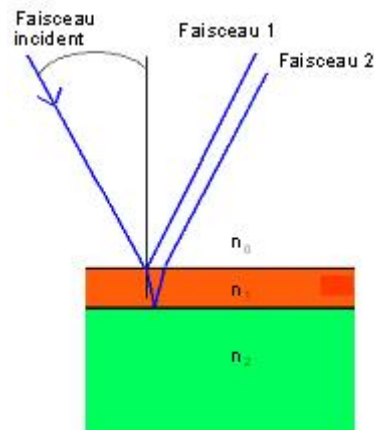


Figure 3.4 : Représentation schématique de la réponse optique d'un empilement de couches d'indice optique et d'épaisseur différents.

Il est très important de comprendre ici, que l'intensité résultante au point M (sur l'écran de la figure 3.2) est la somme des ondes émises par chaque ligne et chaque creux. Comme précédemment, nous sommes dans une approximation de Fraunhofer, les ondes sont donc considérées comme planes. Les réponses lumineuses des lignes et des creux sont calculées par la méthode des matrices de transfert⁶. Cette méthode permet de connaître les coefficients de réflexion et de transmission d'une superposition de couches caractérisées par leur épaisseur et leur indice optique. De plus, elle prend en considération les réflexions multiples. Chaque ligne et chaque creux apportent deux types de contribution (Fig. 3.4) :

- surfacique : dû à la différence des indices à l'interface (n_0 et n_1).
- volumique : dû aux réflexions multiples (faisceau 1 et 2).

En tenant compte de tous ces paramètres (indice, épaisseur, réflexions multiples, creux, lignes etc.), et en calculant les réponses lumineuses des lignes et des creux grâce au formalisme des matrices de transfert, on obtient par exemple, dans le cas d'un réseau de dendrimères d'épaisseurs variables, une puissance diffractée P_1 augmentant avec l'épaisseur de dendrimères.

Ensuite, en ce qui concerne l'interprétation du gain G , dans le cas d'un réseau en réflexion, comme en transmission, le rapport $\frac{P_1}{P_i}$ a l'avantage d'être indépendant des fluctuations du laser, c'est-à-dire indépendant de l'intensité du faisceau incident. Durant une

interaction le rapport $\frac{P_1}{P_i}$ va évoluer selon les fluctuations des ondes émises par les lignes et les creux. Donc le gain G va dépendre de la différence d'émissions entre les lignes et les creux, avant et après interaction. De plus, en considérant que les interactions sont spécifiques sur les lignes et non spécifiques sur les creux, la mesure effectuée sur le capteur de l'ordre 1 compare la différence entre ces deux interactions. Au final, on retrouve ici l'avantage du gain expliqué au chapitre I (I-5-3) : il est possible de savoir si une interaction est spécifique ou non spécifique selon la valeur du gain : c'est-à-dire selon la valeur de l'amplitude des ondes émises par les lignes et les creux.

III-1-2 : Simulation de la réponse d'un réseau

Nous allons à présent étudier les simulations numériques découlant des calculs précédents. Plusieurs simulations ont été réalisées pour différents cas : interaction spécifique idéale, interaction spécifique non idéale, interaction non spécifique. Pour chaque cas, certains paramètres comme l'angle d'incidence et la longueur d'onde du faisceau laser ont été fixés à 0° (incidence normale au substrat) et 633 nm (laser Hélium Néon (HeNe)) respectivement. De même, la surface des réseaux a été fixée à $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$. Le substrat proposé pour les simulations est du verre caractérisé par un indice optique de 1.45. Nous allons à présent étudier chacune de ses situations.

- **Simulation de la diffraction dans un cas d'interaction spécifique idéale.**

On définit, par interaction spécifique idéale, le cas où les molécules cibles s'empilent parfaitement et seulement sur les molécules sondes (Fig. 3.5)

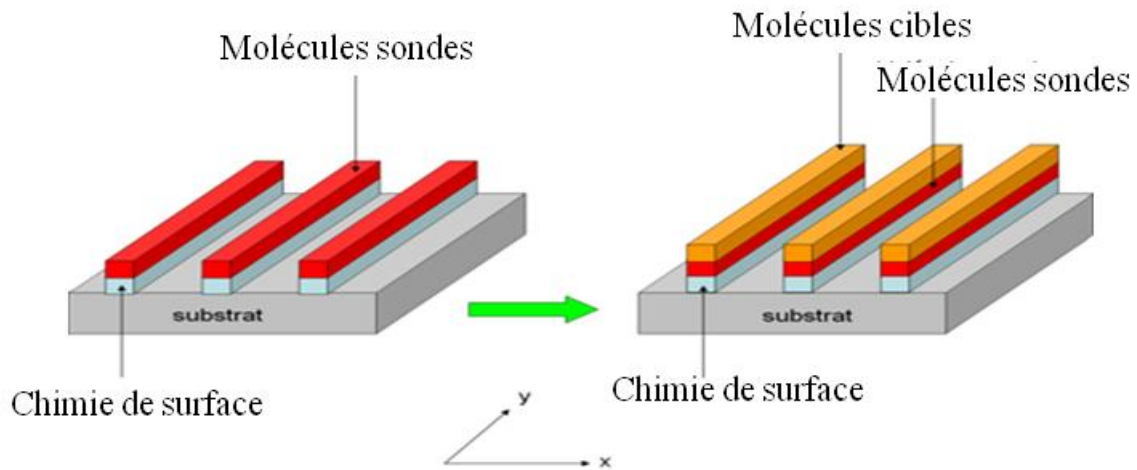


Figure 3.5 : d'après [1]. Représentation schématique d'une interaction spécifique idéale : les molécules cibles viennent s'empiler uniquement sur les molécules sondes.

Différents paramètres ont été étudiés : rapport entre la largeur des lignes et la période du réseau, épaisseur de la chimie de surface, type de chimie de surface. Pour chaque paramètre, des simulations ont été réalisées afin de trouver l'optimum pour la détection par diffraction. Comme il est possible de le voir sur la figure 3.6, la puissance diffractée est maximale pour une largeur de ligne égale à la moitié de la période. Il est aussi possible de voir que plus la période augmente plus le signal diffracté va avoir une forte amplitude. Cependant, comme expliqué au chapitre I, nous avons choisi une période de $1\mu\text{m}$ afin d'optimiser la mesure de l'ordre 1. Cette simulation nous renseigne que dans ce cas, la largeur de lignes optimale à choisir est de 500 nm.

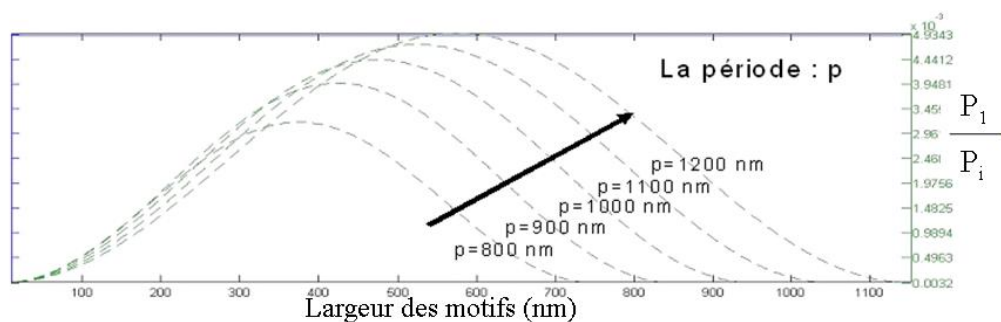


Figure 3.6 : d'après [1]. Rapport $\frac{P_1}{P_i}$ de puissances diffractées pour des largeurs de lignes et des périodes différentes. Puissance diffractée en fonction de la largeur des lignes pour 5 valeurs de périodes différentes.

L'épaisseur de la chimie de surface a aussi été simulée pour différentes valeurs variant de 1 à 120 nm. Le résultat de ces simulations a donné un résultat délicat. En effet, le gain du système tend à diminuer avec l'épaisseur de la chimie de surface, quelque soit le type de molécules sondes ou cibles ajoutées. Cependant, le signal diffracté initial sera plus important lorsque la chimie de surface sera épaisse. Ceci peut s'expliquer par le fait que la variation du signal diffracté, engendrée par le changement de l'épaisseur de la couche de molécules (chimie de surface + sondes + cibles), devient de plus en plus faible lorsque l'épaisseur de la chimie de surface augmente. Plus l'épaisseur de la chimie de surface est grande (de l'ordre de plusieurs dizaines de nanomètres et plus), plus la puissance diffractée à l'ordre 1 est importante, mais plus la variation du signal, donc le gain sera faible. Une situation inverse se présente en prenant une chimie de surface très peu épaisse (de l'ordre de quelques nanomètres) : nous aurons un grand gain, mais un signal diffracté initial petit. Nous devons donc trouver un compromis entre une grande puissance diffractée permettant une mesure fiable (optimisation du rapport signal/bruit) et un gain maximal. Le paramètre à optimiser reste donc la taille des molécules sondes par rapport aux molécules cibles. En effet, nous devons privilégier des molécules sondes les plus petites possible dans le but d'avoir un bon compromis entre la puissance diffractée à l'ordre 1 et le gain. De même, il est apparu grâce aux simulations, que les indices optiques des molécules sondes et cibles devaient être le plus haut possible afin de faciliter la détection.

Au final, les valeurs numériques des puissances relatives et du gain obtenues nous permettent d'affirmer que la détection d'une interaction entre une molécule sonde et une molécule cible est possible et sensible, dans les conditions que nous avons établies plus haut.

Pour la suite des simulations, nous nous placerons dans le cas d'un réseau ayant pour période 1 μm et pour largeur de ligne 500 nm, cas où le rapport période/largeur de lignes est optimum. Nous allons à présent étudier un cas non idéal d'interaction spécifique.

- **Simulation de la diffraction dans un cas d'interaction spécifique non idéale.**

Une interaction spécifique non idéale est représentée sur la figure 3.7. Comme il est possible de le voir, ce cas-ci représente une interaction entre les molécules sondes et cibles sur une plus grande surface. En effet, la molécule sonde, empilée parfaitement sur la chimie de surface dans le cas précédent, va dans ce cas, se déposer aussi sur le côté des lignes de la

chimie de surface. Il va donc y avoir un élargissement des lignes à cause de la molécule sonde, mais aussi à cause de la cible qui va venir, dans ce cas-ci, se déposer aussi sur les côtés des lignes.

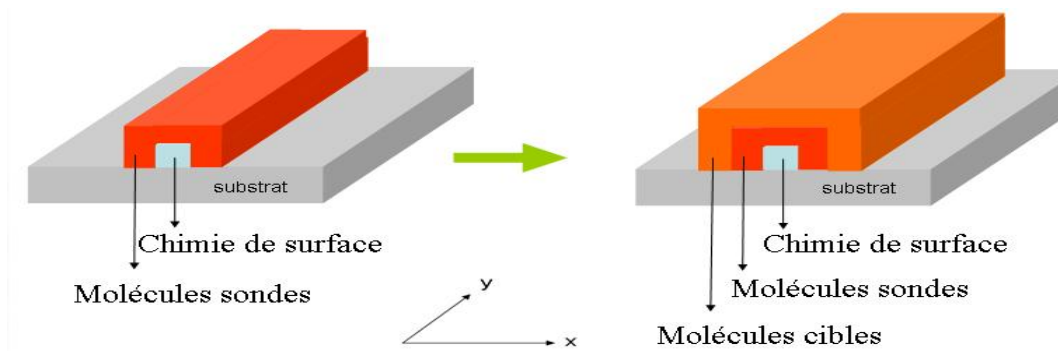


Figure 3.7 : d'après [1]. Représentation schématique d'une interaction spécifique non idéale. Les lignes du réseau sont élargies par la présence de la molécule sonde puis de la molécule cible. Il y a dans ce cas un élargissement des lignes vertical et horizontal.

Après simulations¹, le résultat confirme qu'il est possible de détecter une interaction spécifique, même si celle-ci a lieu verticalement et latéralement. Le gain sera même plus grand comparé au cas d'une interaction spécifique idéale (Fig. 3.5 : empilement uniquement vertical).

Toujours dans les mêmes conditions (période, laser..), nous allons à présent étudier le cas d'une interaction spécifique **et** non spécifique.

- **Simulation de la diffraction dans un cas d'interaction spécifique et non spécifique.**

Pour les premiers cas étudiés, nous avons considéré que les interactions étaient totalement spécifiques. Cependant, dans certains cas, une interaction non spécifique (dans les creux) peut venir s'ajouter à l'interaction spécifique (Fig. 3.8). On pourra citer comme exemple des cas où il y aurait eu un mauvais choix du substrat, de la chimie de surface, ou encore une dénaturation de la molécule cible ou de la chimie de surface etc.

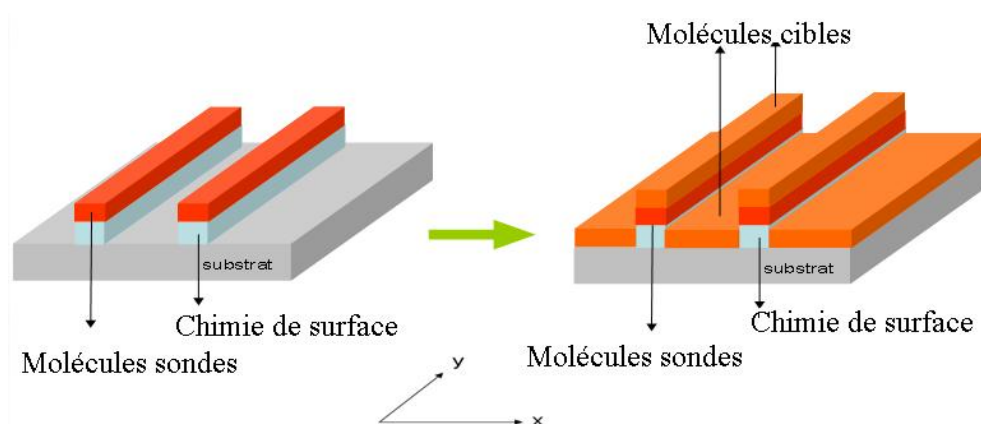


Figure 3.8 : d'après [1]. Représentation schématique d'une interaction spécifique (sur les molécules sondes) couplée à une interaction non spécifique (la molécule cible interagit avec les creux soit directement avec le substrat).

Les résultats des simulations¹ indiquent que dans un cas tel que celui-ci, il est impossible de détecter l'interaction spécifique (sur les lignes). Le gain est voisin de 0.

Au final, une superposition d'une interaction spécifique et non spécifique, avec la même influence de chacune des interactions, est indétectable avec notre système. Cependant, dans le cas d'une interaction uniquement non spécifique (Fig. 3.9) il est possible, en étudiant le gain, de savoir que les molécules ne se sont pas déposées sur les lignes mais exclusivement dans les creux du réseau. Cette situation se traduit par une diminution de la puissance diffractée et donc un gain négatif.

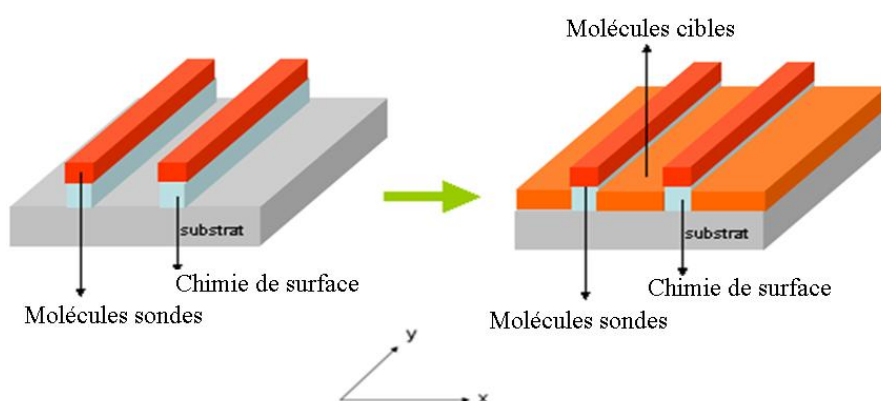


Figure 3.9 : d'après [1]. Représentation schématique d'une interaction non spécifique (la molécule cible interagit avec les creux, soit directement avec le substrat).

Ainsi, la biopuce « diffractante » est capable de reconnaître une interaction spécifique et une interaction non spécifique quand elles ont lieu séparément. En effet, le couplage des deux types d'interactions (avec la même influence de chacune des interactions) est indétectable avec ce système. Au final, comme écrit au chapitre I, notre biopuce « diffractante » comporte 4 états possibles (Fig. 3.10) correspondant à 3 valeurs différentes pour le gain G. Le tableau de la figure 3.10 peut être expliqué comme suit :

Etat 1 : l'interaction a eu lieu.

Etat 0 : l'interaction n'a pas eu lieu.

Exemples :

Etat 1-0 : l'interaction a eu lieu avec les lignes mais pas avec les creux.

Etat 1-1 : l'interaction a eu lieu avec les lignes et avec les creux.

Les différents états de la biopuce	Interaction entre Les molécules cibles et les lignes	Interaction entre Les molécules cibles et les creux	Valeur du Gain G	Conclusion
1-1	Oui	oui	$G=0$	Impossible de conclure
1-0	Oui	non	$G>0$	Interaction spécifique
0-1	Non	oui	$G<0$	Interaction non spécifique
0-0	Non	non	$G=0$	Impossible de conclure

Figure 3.10 : Tableau regroupant les 4 états « bio-logiques » possibles de la biopuce « diffractante » après interaction.

Dans les biopuces conventionnelles (à détection par fluorescence), il existe seulement deux états différents : l'interaction a eu lieu (état 1) ou non (état 0). Il est donc parfois nécessaire de faire un contrôle que l'on dit « négatif » afin de savoir si l'interaction ayant eu lieu est spécifique ou non. Comme la biopuce « diffractante » possède 4 états différents, il est possible de savoir, dès le premier test, si l'interaction qui a eu lieu est spécifique (1-0) ou non (0-1). Cette biopuce se passe donc de la deuxième série de tests de contrôle.

Pour résumer l'ensemble des simulations, nous allons faire un bilan des différents résultats obtenus :

1. la période du réseau doit être deux fois supérieure à la largeur des lignes.
2. La chimie de surface doit être la plus fine possible, afin d'avoir un gain mesurable. Il en découle que les molécules composant la chimie de surface doivent être les plus petites possible.
3. La taille des molécules sondes doit être la plus faible possible vis-à-vis de celle des molécules cibles, afin de faciliter la détection.
4. Plus les indices des molécules cibles et sondes seront élevés, meilleure sera la détection.
5. La biopuce est telle qu'il est possible de détecter une interaction spécifique ou non spécifique, mais pas la superposition des deux.
6. Pour des chimies de surface d'épaisseur inférieure à 20 nm, le gain est supérieur à 100%, on peut donc s'attendre à une bonne sensibilité de détection.

Il est à noter que ces points sont vrais dans les conditions expérimentales choisies au préalable, soit :

- ❖ Un faisceau laser en incidence normale par rapport au substrat.
- ❖ Une longueur d'onde de 633 nm pour le laser.
- ❖ Des réseaux de $400 * 400 \mu\text{m}^2$ de surface.
- ❖ Un substrat en verre ayant un indice de 1.45.

Nous connaissons à présent les conditions pour obtenir un gain et un signal diffracté optimums. Nous pouvons donc passer à présent au système expérimental, soit le banc de

diffraction, car nous disposons d'un outil de simulation complet qui permettra une interprétation correcte des mesures.

III-2 : Présentation du système expérimental : le banc de diffraction

Comme nous l'avons vu précédemment, le choix du laser s'est porté sur un HeNe ($\lambda = 633\text{nm}$) ayant une puissance lumineuse de 5 mW. Le faisceau laser a pour ouverture un cercle de diamètre proche de 1 mm. Le montage schématisé peut être observé sur la figure 3.11.

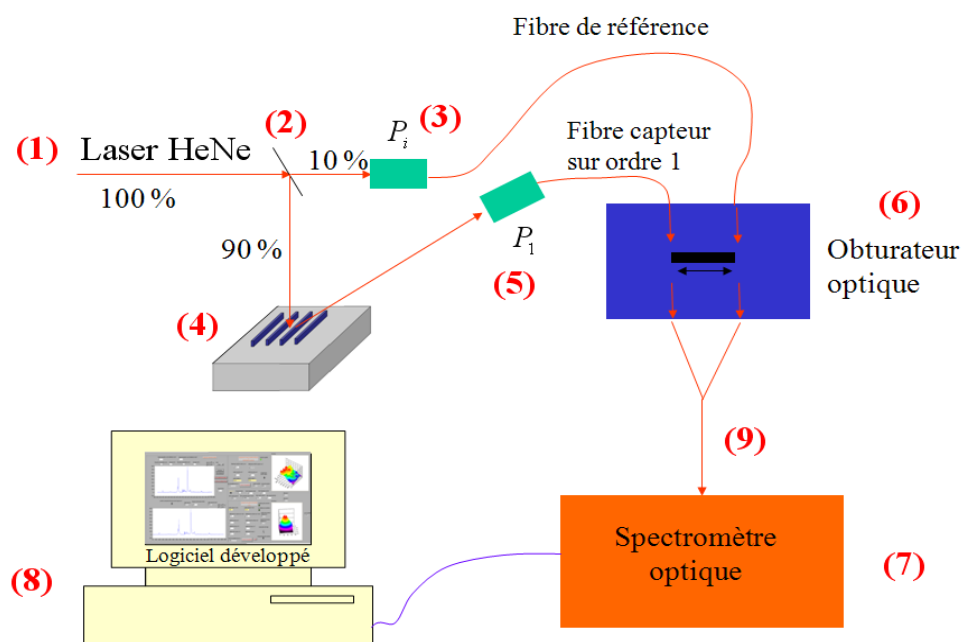


Figure 3.11 : d'après [1]. Représentation schématisée du montage expérimental pour l'étude d'interactions par diffraction.

Le faisceau laser (1) est divisé par une lame semi-réfléchissante (2) en deux parties. La première qui va sur un photodétecteur (3) mesurant P_i , ne représente que 10% du signal incident. La deuxième qui représente donc 90% du faisceau incident, est envoyée sur l'échantillon (4). Ce faisceau est diffracté par le réseau de biomolécules, puis récupéré, après diffraction, par un photodétecteur (5) mesurant P_1 (pour un réseau de période $1\text{ }\mu\text{m}$ et dans nos conditions expérimentales, l'angle de diffraction du premier ordre est proche de 40°). Il est à noter que l'emploi du terme « photodétecteur » seul est un abus de langage. Ce que nous

appelons photodétecteur est en fait l'extrémité d'une fibre optique, qui couplée avec le monochromateur, agit comme un photodétecteur. Cependant pour alléger l'écriture, nous emploierons simplement « photodétecteur ». Les deux photodétecteurs (3) et (5) nous permettent d'acquérir en temps réel, les puissances du faisceau incident (P_i) et du premier ordre de diffraction (P_1). Les fibres couplées aux photodétecteurs sont envoyées sur un obturateur optique (6), lui-même relié par une fibre bifurquée (9) au spectromètre (7). Il est ainsi possible de choisir quelle fibre est envoyée sur le spectromètre grâce à l'obturateur optique qui sélectionne le faisceau (P_i ou P_1) qu'il envoie (Fig. 3.13). Le tout est commandé par un logiciel d'acquisition des données (8) qui calcule la valeur globale de la puissance du signal diffracté $\frac{P_1}{P_i}$, indépendamment des fluctuations du laser. Une photographie du montage

optique (laser + échantillon + photodétecteurs) est visible sur la figure 3.12. Il est à noter que l'échantillon et le photodétecteur recueillant l'ordre 1 de la diffraction sont placés sur des micro platines pouvant se déplacer respectivement selon les directions x,y et y,z. Il est ainsi facile de positionner le faisceau laser sur l'échantillon et de mesurer l'ordre 1 de la diffraction sur le photodétecteur.

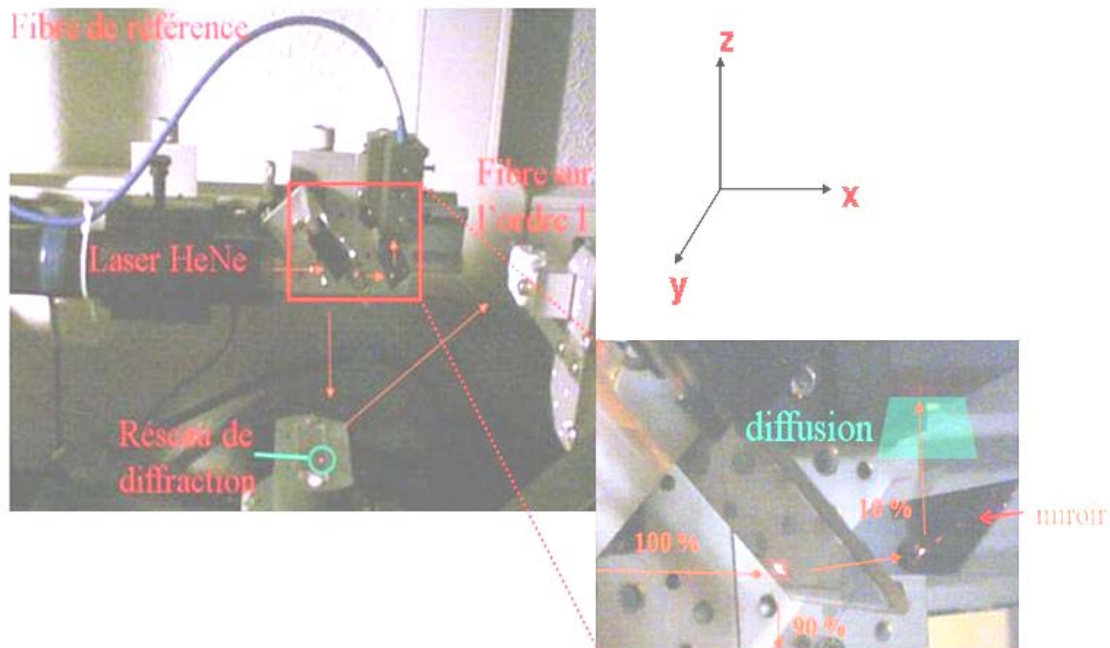


Figure 3.12 : d'après [1]. Photographie du montage expérimental de diffraction. Le trajet du faisceau laser est symbolisé par des flèches rouges (haut et bas).

Haut-gauche : vue d'ensemble du montage

Bas-droite : Lame semi-réfléchissante et effet sur le faisceau laser.

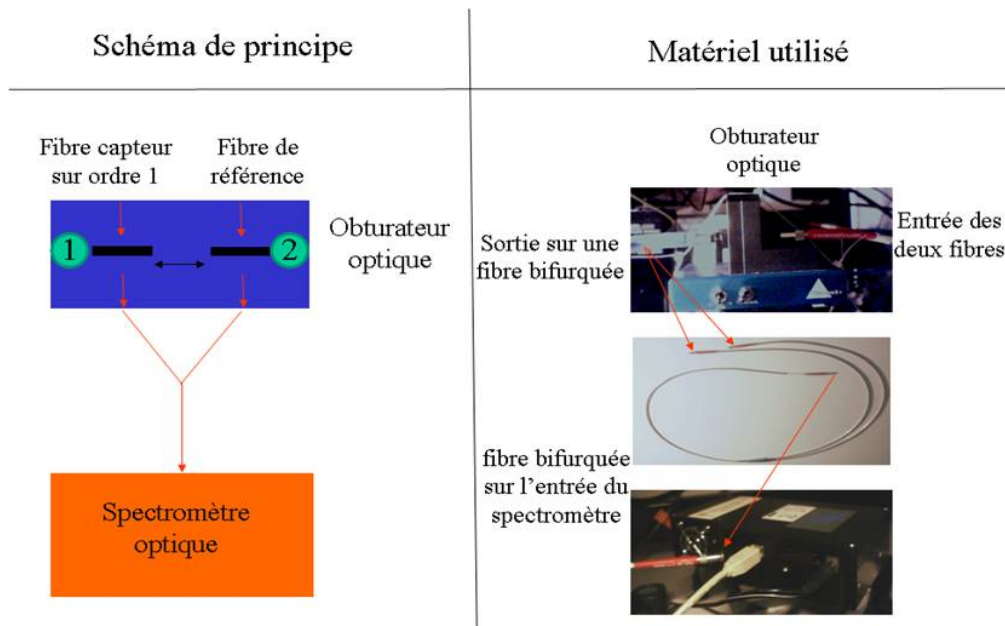


Figure 3.13 : d'après [1]. Représentation schématique (gauche) et photographie (droite) de l'obturateur optique permettant l'acquisition des intensités lumineuses des faisceaux incident et diffracté.

L'obturateur optique permet de sélectionner la lumière provenant de la fibre que l'on souhaite récupérer. En effet, un cache peut arrêter le trajet d'un des faisceaux lumineux, et donc empêcher sa transmission au spectromètre. L'obturateur possède deux positions :

Position 1 : collecte de la lumière de la fibre de référence (faisceau incident),

Position 2 : collecte de la lumière provenant de la fibre du photodétecteur 1 : faisceau diffracté.

Le spectromètre sert donc à collecter la puissance, alternativement, de chacun des signaux. Comme le spectromètre ne sélectionne qu'une longueur d'onde (réglé ici sur 633 nm), il élimine naturellement le bruit extérieur et parasite. Son principe de fonctionnement est simple : il compte le nombre de photons qui l'illumine. Ce nombre de photons est converti en nombre de coups. Cependant, il faut faire attention car $1 \text{ photon} \neq 1 \text{ coup}$. En effet 1 coup est proportionnel à un certain nombre de photons reçus, et cette proportion dépend du fabricant (ici : 22 photons/coup).

Tout ce dispositif a été automatisé afin de simplifier au maximum le travail à l'utilisateur. En effet, nous avons à étudier des matrices de réseaux, et il serait long et fastidieux pour l'utilisateur de rechercher les ordres 1 de diffraction pour chaque réseau

déposé. Les microplatines sur lesquelles sont placés le porte échantillon et le photodétecteur 1 sont commandées par un logiciel, contrôlable automatiquement. L'utilisateur doit ainsi simplement :

1. Positionner son échantillon afin de pouvoir acheminer correctement le faisceau incident sur un des réseaux présents.
2. Positionner approximativement le photodétecteur 1 sur le trajet du faisceau diffracté à l'ordre 1 afin qu'il puisse collecter le signal lumineux.
3. Lancer le programme

Une fois le programme lancé, il faut trouver le maximum de la puissance diffractée par l'ordre 1 du réseau choisi. Pour cela, l'utilisateur définit des matrices de déplacement pour le photodétecteur 1, afin de trouver une puissance P_1 maximale et d'optimiser sa position (le détecteur sera centré sur le maximum). Une fois $P_{1\max}$ trouvée pour le premier réseau, l'utilisateur définit une matrice de déplacement à l'aide du programme, pour l'ensemble des réseaux (Fig. 3.14), c'est-à-dire qu'il définit les distances entre les réseaux (x,y) et le nombre de réseaux (x,y). Au final, le programme trouvera lui-même le maximum de l'ordre 1 de diffraction de chaque réseau. L'obturateur optique entre alors en jeu : il enverra à tour de rôle au spectromètre P_1 ou P_i , afin de pouvoir obtenir le rapport des deux signaux : $\frac{P_1}{P_i}$. Il est à noter que la mesure de P_i n'est pas obligatoirement nécessaire à chaque mesure de P_1 . Il est possible de ne mesurer P_i qu'au début de l'acquisition pour un réseau.

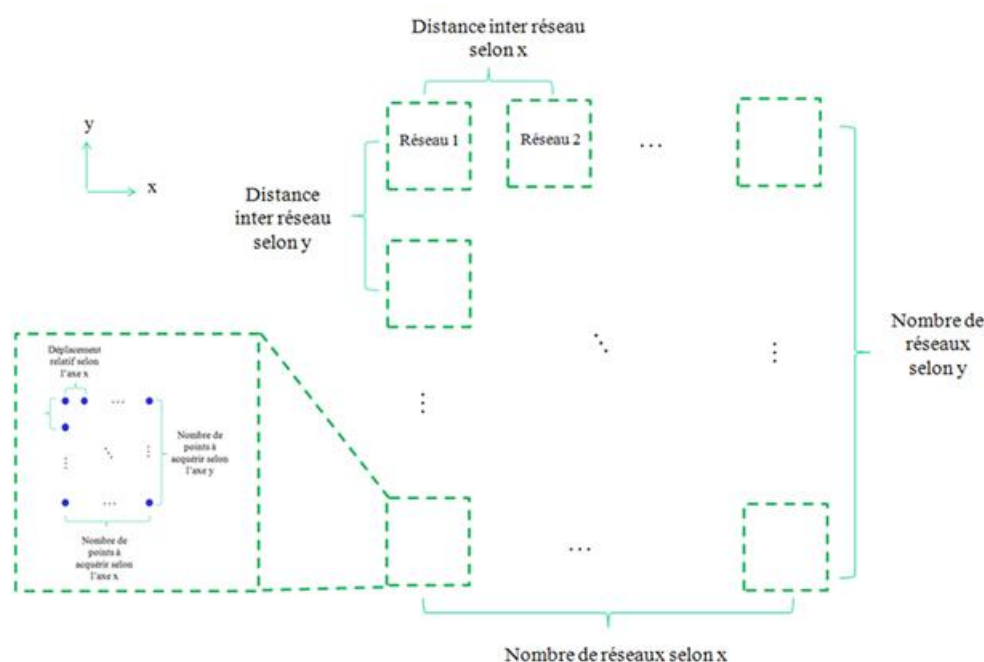


Figure 3.14 : d'après [1]. Matrice définie par l'utilisateur des différents réseaux à localiser.

Afin de trouver la position optimale de chaque réseau, une matrice permettant la cartographie du signal de diffraction est définie et utilisée pour chaque réseau (bas gauche).

III-3 : Présentation des résultats

III-3-1 : Détection d'une interaction protéine - Anticorps

L'avantage de ce système expérimental est qu'il peut être utilisé soit en statique soit en temps réel. La première série d'expérience qui sera présentée, s'est déroulée en temps réel. Afin que cette analyse soit possible, une cellule fluidique a été ajoutée au système (Fig. 3.15). Sur cette figure, la lame portant le réseau est placée à l'envers pour rendre possible le passage d'un fluide sur les biomolécules composant le réseau. Il est à noter que la détection a toujours lieu en réflexion.

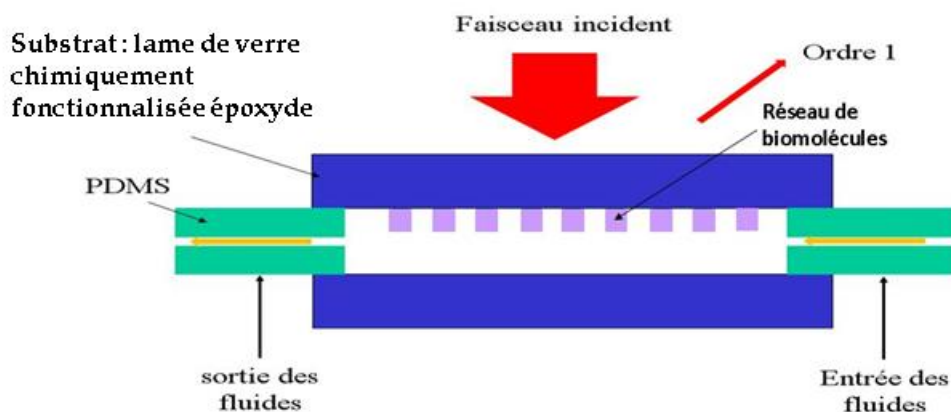


Figure 3.15 : Représentation schématique de la cellule fluidique permettant une détection d'interaction en temps réel.

L'interaction que nous avons étudiée ici, est celle de protéines A, qui constituent les molécules sondes fixées sur la surface, avec des anticorps (AC) anti-protéine A (présentant une grande affinité avec ses protéines), constituant les molécules cibles. Les protéines A ont été fonctionnalisées avec de la biotine. La chimie de surface choisie a donc été la streptavidine (II-3-2), que nous avons déposée par μ CP sur une lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde. Deux types d'expériences ont été réalisés : la première concerne l'étude de l'interaction non spécifique entre la cible (AC) et le substrat : réseau de streptavidine et chimie de surface (expériences dites de contrôle), alors que la seconde s'attarde sur l'étude de l'interaction entre la protéine A et son AC complémentaire. Il est à noter que des images AFM ont été réalisées dans le but de mesurer l'épaisseur des lignes de streptavidine déposées par μ CP. Plusieurs images de plusieurs dépôts différents ont été faites et il s'est avéré que les dépôts de streptavidine avaient une épaisseur variant de 3 nm à 10 nm maximum.

Etude de l'interaction non spécifique entre l'AC et le substrat

Avant d'étudier l'interaction de la protéine et de son AC, nous avons étudié les interactions possibles entre l'AC et le substrat fonctionnalisé chimiquement époxyde. En effet, l'AC étant fonctionnalisé amine, il y a de forts risques de le voir se fixer directement sur la lame fonctionnalisée époxyde. Nous avons donc réalisé un contrôle négatif, en temps réel, afin de vérifier quelles interactions avaient lieu et obtenir ainsi un gain du signal qui nous servira de contrôle lors de la réaction entre la protéine A et son AC.

La streptavidine a donc été déposée, par μ CP, en réseau de $400\mu\text{m} \times 400\mu\text{m}$ (pas de $1\mu\text{m}$ pour une largeur de ligne de 500 nm) sur une lame de verre fonctionnalisée époxyde. Cette lame a ensuite été montée dans la cellule fluidique, tout d'abord pour rincer le surplus de streptavidine, c'est-à-dire les molécules non fixées au substrat, puis pour injecter les AC complémentaires, $[C] = 80\text{ }\mu\text{g/mL}$, et étudier les potentielles interactions. Après 3 étapes de rinçage de la streptavidine avec du Phosphate Buffer Saline (PBS), les AC ont été incubés pendant 7 heures, avant 3 rinçages avec du PBS. Au final, chaque réseau (6 en tout) a été étudié, et nous avons obtenu le gain du signal (G) pour chacun des réseaux (Fig. 3.16)

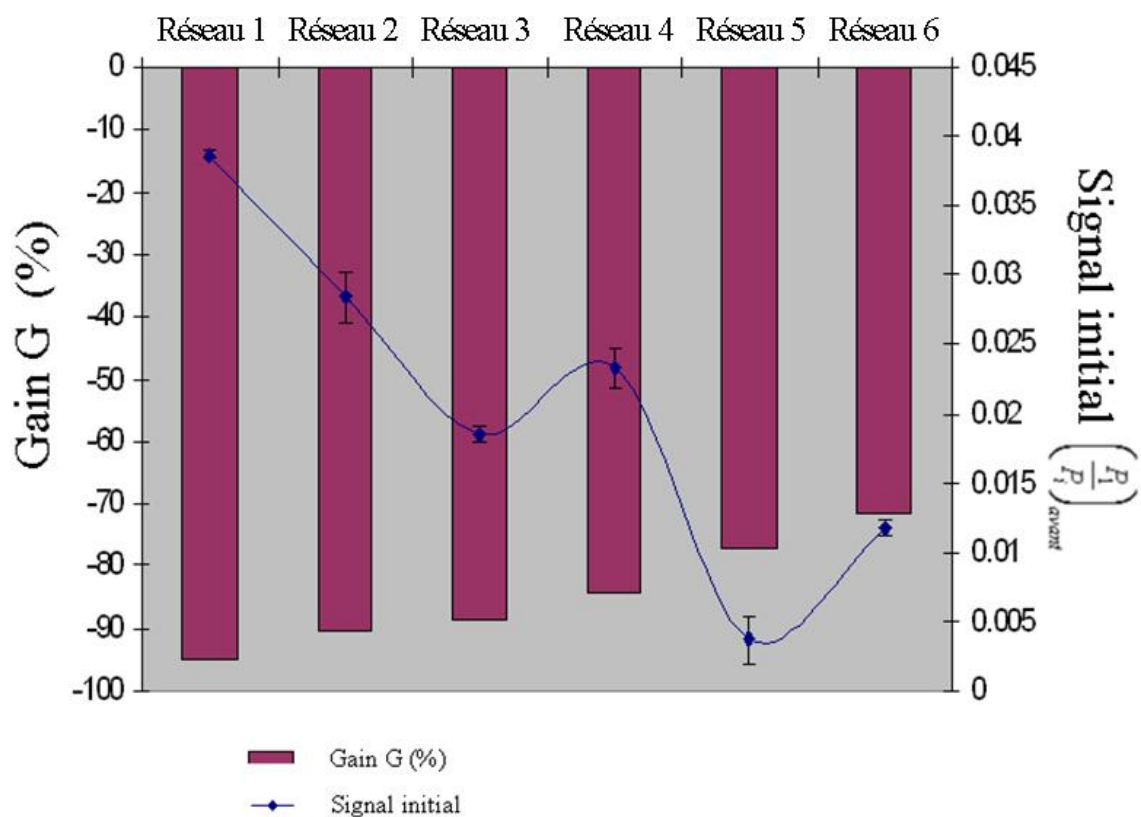


Figure 3.16 : d'après [1]. Graphique représentant le gain G du signal (barres) et le signal initial (avant interaction : courbe), lors de l'expérience de contrôle réalisée entre l'AC et le substrat. Ici le signal initial représente la puissance diffractée avant incubation des AC.

Tout d'abord, une première remarque est la différence de signal initial entre les différents réseaux. Cela s'explique par le fait que lors du dépôt par μ CP de la streptavidine, aucun réseau n'est physiquement identique, à cause de la réalisation manuelle des dépôts. C'est-à-dire que l'épaisseur des lignes de streptavidine va varier, potentiellement il se peut même qu'un réseau soit abimé et donc ne sorte pas entièrement, et comme le signal initial est

lié à l'épaisseur de la chimie de surface, leur ordre 1 de diffraction sera différent. Le deuxième élément à voir est l'évolution du gain, qui varie entre -75% et -95% ($G < 0$: interaction non spécifique III-1). Il est à noter que plus le signal initial de diffraction du réseau est important avant interaction, plus le gain va être élevé (en négatif), c'est-à-dire que le signal va fortement diminuer pendant l'interaction, voir même parfois s'éteindre. Ceci peut être expliqué par la hauteur des lignes du réseau de streptavidine. Le signal s'éteindra dans le cas où les AC formeront dans les creux une couche aussi épaisse que celle des lignes de streptavidine (Gain $G = -100\%$) : il n'y a plus de réseau, donc plus de signal. Afin de comprendre exactement ce qui se passe lors de cette expérience, des simulations ont été faites dans un cas d'interaction non spécifique (soit : interaction avec les creux du réseau). Lors du suivi du gain en temps-réel durant l'interaction non spécifique, deux cas sont ressortis :

- ❖ Premier cas : phase décroissante du Gain jusqu'à un minimum de -100% (plus de signal : les creux sont entièrement comblés) $\Rightarrow$ les molécules dans les creux forment une couche plus épaisse que les réseaux préformés.
- ❖ Deuxième cas : phase montante du gain (après la phase décroissante, cependant G reste toujours négatif). Dans ce cas $\Rightarrow$ Les molécules dans les creux forment une couche moins épaisse que les réseaux préformés (lavage par exemple)

La phase montante qu'observe le gain G après sa phase décroissante durant les simulations, peut être due au rinçage des molécules. En effet :

- première phase : de nombreuses molécules interagissent non spécifiquement dans les creux du réseau $\Rightarrow$ diminution du gain : la couche formée dans les creux est plus épaisse que la ligne de streptavidine.
- Après rinçage : des molécules dans les creux se détachent. Le gain augmente (les lignes de streptavidine sont plus épaisses que les lignes dans les creux) mais reste négatif dû à l'interaction non spécifique.

Au vu des variations du Gain durant l'interaction pour cette expérience (le gain G est décroissant durant l'interaction), nous pouvons dire que les lignes formées avec les AC sont plus épaisses que les lignes de streptavidine. Cette conclusion a pu être vérifiée par AFM¹. Il y a donc une interaction non spécifique entre les AC et la surface fonctionnalisée époxyde. A présent que nous connaissons la variation du signal et le type d'interaction non spécifique qui

a lieu entre le substrat et la cible (AC), nous pouvons procéder à l'expérience suivante, soit l'étude d'interaction entre la protéine A et son AC complémentaire.

Etude de l'interaction spécifique entre la protéine A et son AC complémentaire

Pour cette expérience, nous avons déposé par μ CP, des réseaux de streptavidine sur une lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde. Après rinçage de la streptavidine, nous avons incubé la protéine A biotinylée, concentrée à $60\mu\text{g/mL}$ dans du PBS, durant 45 min, puis nous avons injecté du PBS afin de rincer le surplus de protéine A. Après rinçage, nous avons incubé les AC complémentaires, concentrés à $80\mu\text{g/mL}$, en suivant le même protocole que lors de la première expérience (7h, 3 rinçages). Comme précédemment, nous obtenons une courbe représentant le gain après interaction entre les protéines A et leurs AC complémentaires ainsi que le signal initial (avant incubation des AC) (Fig. 3.17). La première chose à noter est que nous avons un gain positif. Ce dernier varie de 200% à 1000%, nous sommes donc dans un cas d'interaction spécifique. Contrairement au contrôle négatif, le gain augmente avec la décroissance du signal initial. Ceci peut être expliqué par le fait que le signal initial représente ici l'épaisseur des lignes de streptavidine + protéine A. Plus l'épaisseur des lignes va décroître, plus le signal initial avant injection des anticorps va diminuer et plus le gain après interaction va alors augmenter. Après observation, il s'avère que les lignes de streptavidine + protéine A ont une épaisseur comprise entre 3 et 10 nm au maximum. Ceci est considéré comme une faible épaisseur et permet donc d'avoir un signal initial faible et donc un gain important lors de l'interaction entre les AC complémentaires à la protéine A. On se retrouve ici dans le même cas que celui vu au III-1 : plus le signal initial de diffraction va être important, plus les lignes du réseau vont être épaisses et plus le gain final sera faible (réseau 1 de la figure 3.17). L'ordre de grandeur du gain est important, il varie de 200% à 1000% selon le réseau étudié (4 ici). Il y a donc eu interaction spécifique entre la protéine A et son AC complémentaire. Il est à noter que les barres d'erreur sur le signal initial sont calculées avec les valeurs minimales et maximales mesurées.

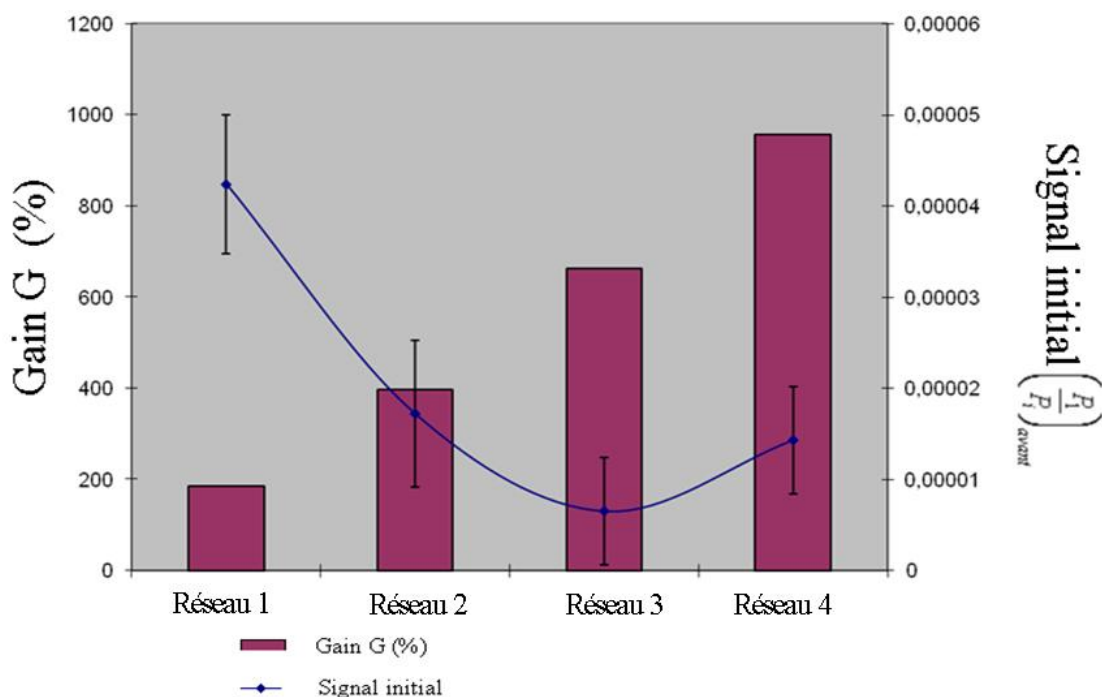


Figure 3.17 : d'après [1]. Graphique représentant le gain G du signal (barres) ainsi que le signal initial (avant interaction : courbe) lors de l'expérience réalisée entre la protéine A et son anticorps complémentaire. Ici le signal initial représente la puissance diffractée avant incubation de l'AC.

Au final, grâce à cette expérience, au-delà de démontrer la possible détection d'une interaction AC-Antigène, nous validons les simulations : il est en effet possible de détecter une interaction spécifique entre la protéine A et son AC complémentaire, malgré les interactions non spécifiques entre l'AC et le substrat. La variation du gain sur la figure 3.17 nous indique en effet une interaction spécifique, même si les deux types ont eu lieu en même temps. Comme vu sur le graphique de la figure 3.17, plus les lignes sont fines, plus la détection de l'interaction spécifique est sensible (réseau 3 et 4 par exemple avec un gain de plus de 600 %).

Nous allons à présent voir deux autres types d'interactions qui ont été étudiés avec le banc de diffraction : une interaction entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires et une interaction entre deux oligonucléotides non complémentaires.

III-3-2 : Détection d'une interaction entre deux brins d'ADN complémentaires.

L'hybridation entre deux brins d'ADN parfaitement complémentaires n'a, pour l'instant, jamais pu être détectée en optique sans marquage, par diffraction. Les oligonucléotides sont en effet de petites molécules, comparées à des protéines par exemple, et sont donc difficilement détectables. Bien que la sensibilité du montage expérimental soit élevée, l'objectif de détecter une hybridation entre deux brins parfaitement complémentaires reste ambitieux.

Ces études ont été réalisées en mode statique, soit sans cellule fluïdique. Dans ce cas-ci, la lame (substrat) est posée sur le montage expérimental, après dépôt des molécules sondes, afin de mesurer le maximum de diffraction de l'ordre 1 pour chaque réseau présent. La lame est ensuite enlevée pour procéder à l'incubation des molécules cibles, puis replacée sur le montage expérimental. Cette étape étant manuelle, elle comporte le risque de déplacer légèrement la lame par rapport à son emplacement lors de la première étape de mesure (molécules sondes seules). Il y a donc un risque de ne pas « être » exactement au même endroit. La capacité du montage expérimental à trouver le maximum de l'ordre 1 de diffraction d'un réseau, diminue fortement ce risque. Cependant, cette deuxième recherche de maximum est limitée spatialement tant à cause du pré-enregistrement des coordonnées, qu'à cause du temps nécessaire pour agrandir la zone scannée par le photodétecteur P_1 (Fig. 3.11). La recherche et la mesure précise du maximum d'un ordre 1 (d'un seul réseau) peut en effet prendre la journée entière si le photodétecteur P_1 n'est pas placé correctement sur le faisceau diffracté. Lors de tests réalisés sur la mesure de l'ordre 1 de diffraction, sur une lame enlevée puis remise sur le montage expérimental (plusieurs fois), il s'est avéré que nous obtenions une variation de ce signal pouvant aller jusqu'à $\pm 10\%$ (cas extrême).

A l'aide de la lithographie douce, nous avons immobilisé des oligonucléotides sondes terminaisons amines sur une dendrilame (II-3-1). La dendrilame⁷ est une lame de verre chimiquement fonctionnalisée avec des dendrimères possédant 96 terminaisons aldéhydes. Ces dernières peuvent générer des liaisons covalentes avec les amines facilitant l'immobilisation des oligonucléotides sondes sur la lame. Comme vu au chapitre II, après avoir déposé par lithographie douce les brins sondes, la dendrilame a été réduite afin de

neutraliser les groupements aldéhydes non occupés par les oligonucléotides sondes. Après 3 heures de réduction, la dendrilame a été rincée 3 fois à l'eau milliQ (eau ultra pure), sous agitation. Les lames sont séchées et il est alors possible d'incuber les brins cibles durant 15 minutes dans une chambre d'hybridation couramment utilisée dans les laboratoires de biologie. Après incubation, les dendrilames sont rincées avec de l'eau milliQ. Deux séries de tests ont été réalisées :

- un contrôle négatif entre les oligonucléotides sondes et les oligonucléotides non complémentaires.
- un test entre les deux oligonucléotides parfaitement complémentaires.

La concentration choisie pour les oligonucléotides sondes, cibles et non complémentaires était de 5 μM . Nous avons pris une concentration élevée afin de favoriser l'interaction et d'obtenir un gain mesurable. Pour le test de contrôle, la dendrilame a été réduite après immobilisation des oligonucléotides sondes afin de garder le même protocole entre les tests. Les oligonucléotides utilisés ici ont une taille de 60-mer. Au vu de leur petite dimension, la détection de l'hybridation risque de s'avérer difficile. En effet, nous ne nous attendons pas à un gain élevé voir même mesurable.

Etude de l'interaction non spécifique entre deux oligonucléotides non complémentaires

Les oligonucléotides sondes ont donc été déposés, par μCP , en réseau de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ (pas de 1 μm pour une largeur de ligne de 500 nm) sur une dendrilame. Cette lame a été réduite et rincée, pour ensuite être placée sur le montage expérimental. Après mesure de l'ordre 1 de diffraction de chacun des réseaux étudiés (4 en tout ici), la lames a été incubée pendant 15 minutes, avec la solution contenant les oligonucléotides non complémentaires (15 μL), puis rincée avec de l'eau milliQ. Après séchage sous flux d'azote, elle a ensuite été replacée sur le montage expérimental. En tenant compte des précédentes coordonnées et mesures, le logiciel a pu obtenir l'ordre 1 de diffraction de chaque réseau et le comparer à celui avant l'interaction. La figure 3.18 représente le résultat des différentes mesures : le Gain G et le signal initial. Les valeurs du signal initial ont été mises directement sur les points de la courbe pour simplifier la lecture. De plus, les variations du signal initial étaient faibles comparées à la valeur, d'où l'absence de barres d'erreurs, contrairement aux variations du

gain, pouvant aller jusqu'à $\pm 10\%$, qui sont représentées sur le graphique (les barres d'erreurs sont moyennées à 7%).

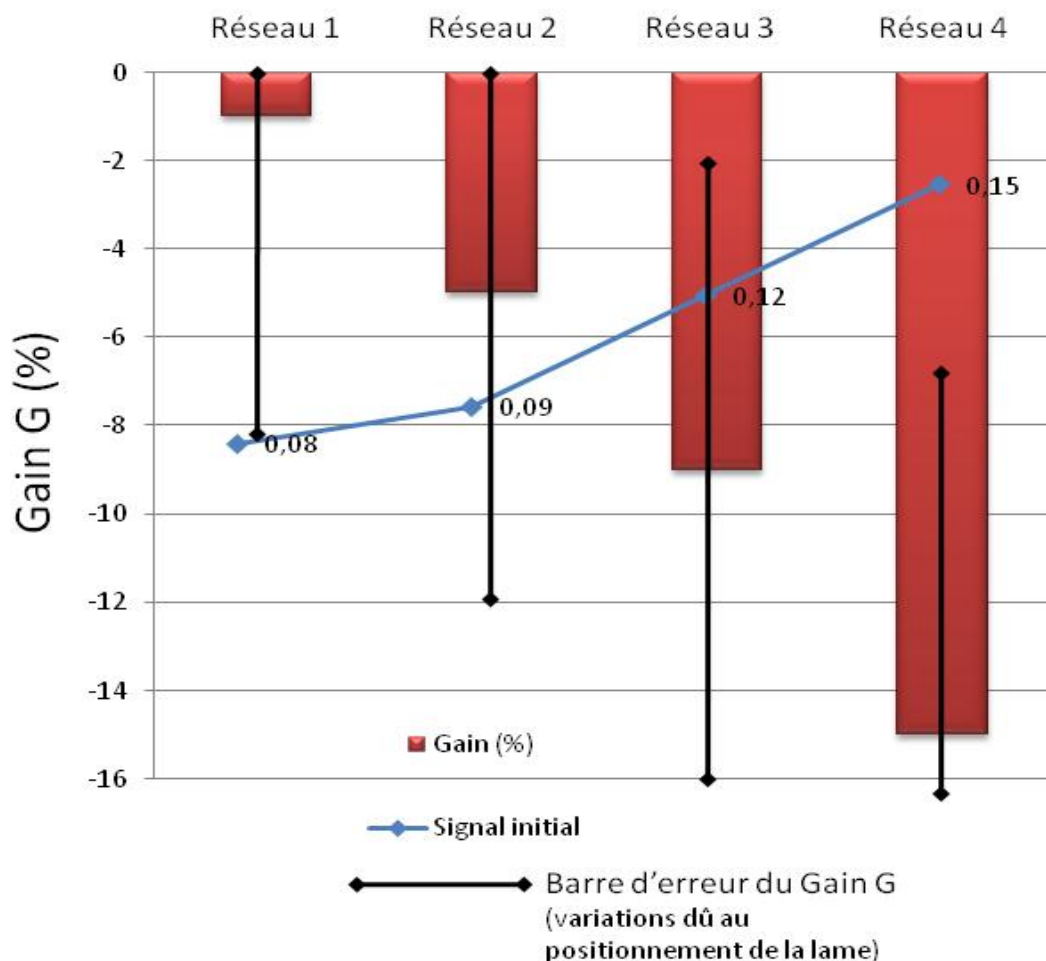


Figure 3.18 : Graphique représentant le gain G du signal (barres) et le signal initial (avant interaction : courbe), lors de l'expérience de contrôle réalisée entre deux oligonucléotides non complémentaires. Ici le signal initial représente la puissance diffractée après dépôt de l'oligonucléotide sonde.

Il faut tout d'abord noter que le signal initial est très important : 0.1 en moyenne. En effet, lors des précédentes mesures, le signal initial avait pour valeur maximale 0,04. Nous avons aussi vu précédemment que la valeur du signal initial dépendait de la hauteur des lignes. Dans ces cas, nos signaux initiaux étaient faibles car la hauteur des lignes l'était : un maximum de 10 nm pour la streptavidine. La variation du gain assez faible, inférieure à -10% en moyenne, s'explique elle, par le fait qu'il n'y a pas eu d'interaction non spécifique avec les

oligonucléotides sondes mais qu'il y a eu quelques interactions non spécifiques avec la dendrilame (dans les creux). Nous savons, d'après la variation du gain, que les creux du réseau d'oligonucléotides ne sont pas entièrement remplis, mais que seule une faible quantité d'interactions non spécifiques a eu lieu.

Avec le contrôle négatif, nous savons qu'il est possible qu'une petite quantité d'oligonucléotides réagisse directement avec la dendrilame. Nous pouvons à présent faire le deuxième test : interaction spécifique entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires.

Etude de l'interaction non spécifique entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires

Comme précédemment, des réseaux d'oligonucléotides sondes de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ (pas de $1 \mu\text{m}$ pour une largeur de ligne de 500 nm) ont été déposés par μCP sur une dendrilame. Cette dernière, après réduction et rinçage, a été placée sur le montage expérimental afin de pouvoir mesurer l'ordre 1 de diffraction des réseaux. Après mesure, les oligonucléotides cibles ont été incubés pendant 15 min sur la dendrilame puis celle-ci a été encore une fois rincée. Après séchage, elle a été replacée sur le montage expérimental. Le résultat des mesures, avant et après interaction, peut être observé sur l'image 3.19. De même que pour la figure 3.18, pour simplifier la lecture, les valeurs des signaux initiaux ont été mises directement sur les points. Les variations étant faibles devant le signal, les barres d'erreurs ne sont pas représentées. Les variations du gain ont par contre été représentées.

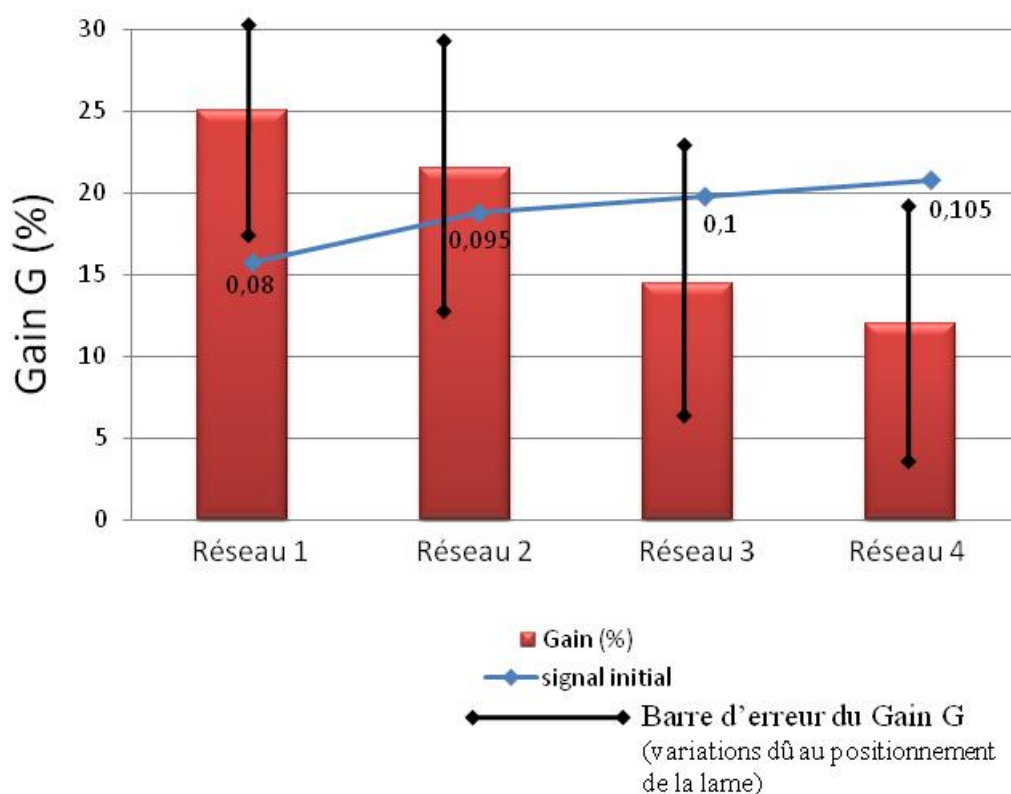
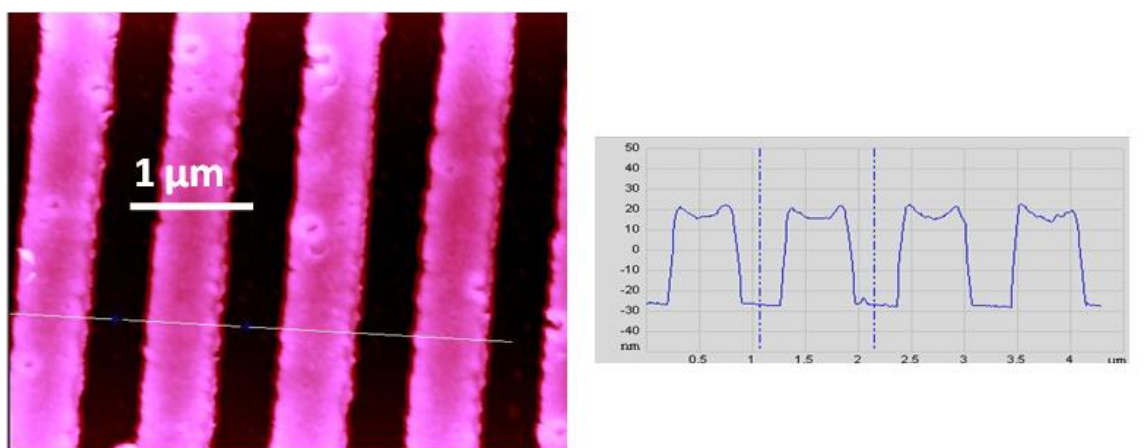


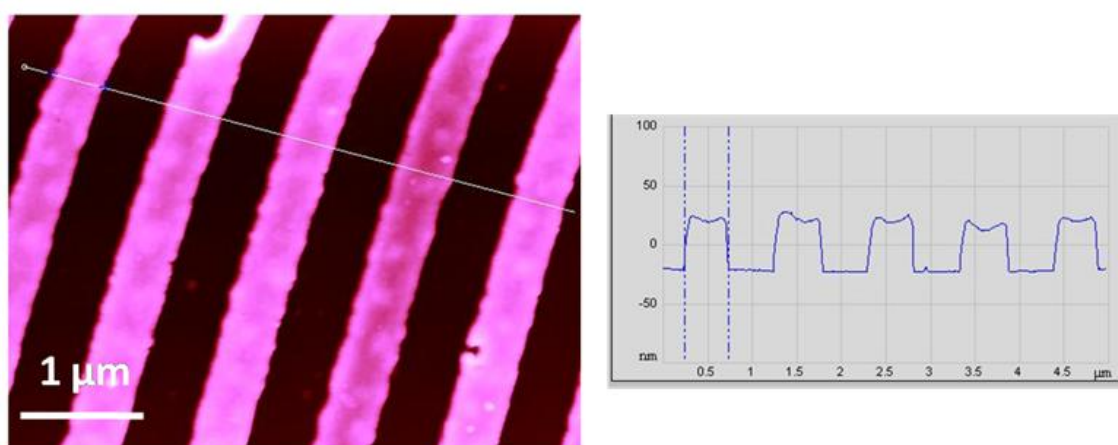
Figure 3.19 : Graphique représentant le gain G du signal (barres) et le signal initial (avant interaction : courbe), lors de l'expérience d'interaction spécifique réalisée entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires. Ici le signal initial représente la puissance diffractée après dépôt de l'oligonucléotide sonde.

Comme sur la figure 3.18, le signal initial avant interaction est élevé (0,09 en moyenne). Le gain obtenu après interaction est en moyenne de 20%. Le gain peut sembler faible au vu des résultats obtenus précédemment (de 200% à 1000%), cependant lors des précédentes expériences, les réseaux de streptavidine déposés avaient une hauteur variant de 3 à 10 nm au maximum. Pour les plus épaisses (signal initial élevé) le gain était de 200%. Nos lignes d'oligonucléotides sondes sont plus épaisses. En effet, des images AFM des réseaux ont été réalisées et il s'est avéré que les lignes avaient une hauteur de 50 nm. Cette hauteur peut expliquer la valeur du signal initial. De même, elle peut expliquer aussi le faible gain, puisque comme nous l'avons vu, plus le signal initial est élevé, plus le gain va être faible, car la différence de hauteur se ressentira moins sur les mesures. Bien que ce gain soit faible, il reste supérieur à la barre d'erreur engendré par le déplacement de la lame. De plus, comme les oligonucléotides sont de petites tailles (60-mer), un gain de 20 % constitue déjà un résultat très positif.

Afin de comprendre la variation du signal, nous avons réalisé à l'AFM des images des réseaux avant, mais aussi après interaction. La figure 3.20 a) est une image AFM du réseau avant interaction et la 3.20 b) une image AFM après interaction. Nous pouvons voir que la hauteur des lignes avant interaction est de 50 nm, et qu'elle est la même après interaction. Cependant, en regardant la coupe, il est possible de voir que le haut de la ligne d'oligonucléotides avant interaction n'est pas plan mais « creux ». Hors sur l'image AFM 3.20 b), les creux sur ces lignes ont été légèrement comblés. Après plusieurs mesures, il s'est avéré qu'en moyenne, les creux étaient comblés avec une épaisseur de 6 nm de cibles.



a) Avant interaction



b) Après interaction

Figure 3.20 : Image AFM et coupe d'un dépôt d'oligonucléotides sondes ($[C] = 5 \mu M$) sur une dendrilame déposé par lithographie douce a) : avant interaction b) après interaction avec les oligonucléotides parfaitement complémentaires ($[C] = 5 \mu M$)

Il est possible de considérer que les cibles se placent au sommet des lignes des sondes, ce qui donne une valeur de gain de 20 %. Ces 20 % représentent donc une interaction spécifique entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires. En effet, l'ajout de 6 nm sur 50 nm, n'influence que peu l'intensité du faisceau diffracté, ce qui peut potentiellement causer un gain faible, mais mesurable.

Il est nécessaire de faire d'autres tests pour étudier le comportement des interactions entre deux oligonucléotides parfaitement complémentaires à différentes concentrations. Il serait possible par exemple de diminuer la concentration des sondes ainsi que leur temps d'incubation afin d'essayer d'obtenir un réseau d'une plus faible épaisseur, pour avoir un signal initial plus faible. En effet, il a été démontré qu'en utilisant le μ CP, il était possible d'obtenir des réseaux d'oligonucléotides de très faibles épaisseurs, dans une échelle plus proche des dépôts de streptavidine⁸. De même en prenant une concentration plus élevée de cibles (10 μ M), il serait possible d'avoir un gain supérieur à 20%, si le signal initial était plus faible.

III-4 : Conclusion

A travers ces quelques résultats, nous avons dans un premier temps validé les simulations. Dans un deuxième temps, nous avons prouvé qu'en temps réel, il était possible de détecter des interactions spécifiques et non spécifiques et de différencier les deux. Nous avons réussi à détecter des interactions spécifiques entre une protéine et son AC complémentaire.

Des mesures d'interaction entre deux brins d'ADN parfaitement complémentaires ont aussi été réalisées mais en statique. Ce test était très ambitieux car, au vu de la taille des molécules, beaucoup plus petites que les AC, les oligonucléotides de 60-mer sont très difficiles à détecter. Cependant, nous avons mesuré un gain négatif dans un cas d'interaction non spécifique (oligonucléotide non complémentaire de la sonde), et à avoir un gain positif lors de l'interaction spécifique. Un gain de 20 % dans un cas d'interaction spécifique est très encourageant (nous ne nous attendions pas à un gain aussi élevé, voir non nul), mais ce résultat prometteur nécessiterait d'autres séries d'expériences. En effet, les déplacements de la lame peuvent jouer sur ce gain, il est donc nécessaire d'automatiser cette étape afin

« d'enlever » l'erreur humaine. De même, des tests à d'autres concentrations peuvent aussi être réalisés. Mais au final, nous avons un résultat très positif et très encourageant.

Références

- 1 : J.C. Cau, **2008**. *Thèse d'université*, Université de Toulouse, LAAS-CNRS.
- 2 : Y. G. Tsay et al *clin chem* **1991**, 37/9, 1502
- 3: J. B. Goh et al *analytical Biochemistry* **2003**, 313, 262.
- 4: J. B. Goh et al *sensors and actuators B* **2005**, 106, 243.
- 5: www. Axela.com
- 6: OPTICS (second edition) Eugene HECHT, ADDISON-WESLEY publishing group, chapitre 9
- 7 : V. Le Berre, E. Trevisol, A Dagkessamanskaia, S Sokol, AM Caminade, JP Majoral, B. Meunier, J. François *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 1.
- 8 : C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirius, E. Trévisiol, J. François, C. Vieu *J. Nanobiotech* **2005**, 3:7.

Chapitre 4 : Améliorations et ouvertures possibles

A travers les trois premiers chapitres, nous avons vu une nouvelle technologie afin de réaliser une plateforme biopuce complète : structuration du support, chimie de surface, choix des molécules, détection des interactions etc. Tout ce qui a été présenté, les techniques développées ou améliorées, sont valables pour le criblage pharmaceutique comme dans un cas plus conventionnel de biocapteur. Chaque étape a été revue ou repensée dans le but de simplifier la tâche à l'utilisateur et de réduire le coût de la plateforme. Ce chapitre présente des améliorations potentielles qui permettraient d'élargir son champ d'action. Une première partie présentera une solution pour obtenir des réseaux nanométriques en passant outre la lithographie électronique. Dans la deuxième partie, nous verrons un autre choix moléculaire afin de rendre la biopuce la plus polyvalente possible.

IV-1 : Le dépôt structuré à l'échelle nanométrique sans lithographie avancée

Jusqu'à présent, tous les réseaux nanométriques de molécules fabriqués par lithographie douce, ont nécessité, en premier lieu, la fabrication d'un moule par lithographie électronique. Comme vu précédemment, l'e-beam est une technique lente, onéreuse mais indispensable pour la fabrication de moules présentant des motifs à l'échelle nanométrique. Se passer de l'étape de fabrication du moule en silicium serait un gain considérable afin de simplifier les procédés. Nous allons maintenant voir une technique qui permettrait le dépôt ordonné de molécules à l'échelle nanométrique, en utilisant simplement un timbre en PDMS plat ayant subi un traitement plasma O_2 .

IV-1-1 : Déformation du PDMS par traitement plasma Oxygène

Comme expliqué précédemment, le plasma O_2 agit sur le PDMS. Il génère à sa surface une fine couche d'oxyde de silicium le rendant alors très hydrophile pour une courte durée

(chapitre II). Cette couche d'oxyde va entraîner une déformation physique de la surface du PDMS¹ de deux manières différentes. Le premier type de déformation a été étudié dès 1985 par M.A. Grinfield² qui prévoyait, sous l'influence d'un champ extérieur, une relaxation de l'énergie de surface d'un film. Elle aurait pour conséquence d'engendrer une ondulation surfacique à une longueur d'onde spécifique. Cette idée a été mise en évidence par de nombreux auteurs et largement exploitée en science du matériau pour la formation spontanée de semi-conducteurs par épitaxie³. Ce même type d'effet a donc été mis en évidence pour le PDMS⁴⁻⁷, intentionnellement soumis à un traitement de surface créant une fine couche en compression. Cette fine couche, qui peut être obtenue par divers traitements tels que des décharges électriques^{8,9} ou des traitements plasma^{8,10}, est partiellement constituée de SiO_x, les atomes de silicium sont donc liés à 3 ou 4 atomes d'oxygène. Augmenter des doses du plasma permet d'accroître le degré de conversion du silicium organique (SiCH₃) à inorganique (SiO_x)¹¹. Lors du traitement, l'échantillon voit sa température augmentée avec celle du plasma (pour un traitement de 20 secondes, la température peut augmenter jusqu'à 70°). En refroidissant, l'échantillon va se contracter. Cependant, à cause des différences de coefficient de dilatation thermique, la couche d'oxyde de silicium en surface ne se contracte pas autant que le reste du PDMS. Cette différence engendre une compression dans la couche d'oxyde qui produit alors spontanément des ondulations⁴. La création de cette couche en SiO_x entraîne aussi une réduction importante du volume. Cette réduction crée des contraintes en tension à la surface qui provoquent alors des craquelures. En changeant le temps et la dose d'exposition, nous changeons l'épaisseur de la couche d'oxyde et donc l'amplitude des ondulations ainsi que la densité de craquelures. Par exemple, augmenter le temps ou la dose d'exposition aurait pour effet d'accroître l'amplitude des ondulations et la densité des craquelures^{4,12}. Nous pouvons observer sur la figure 4.1 une image AFM de la surface d'un timbre en PDMS ayant été soumis à un traitement plasma. L'image du timbre après traitement montre clairement la formation de structures ordonnées très proches d'un réseau de lignes parallèles ainsi que des craquelures plus larges.

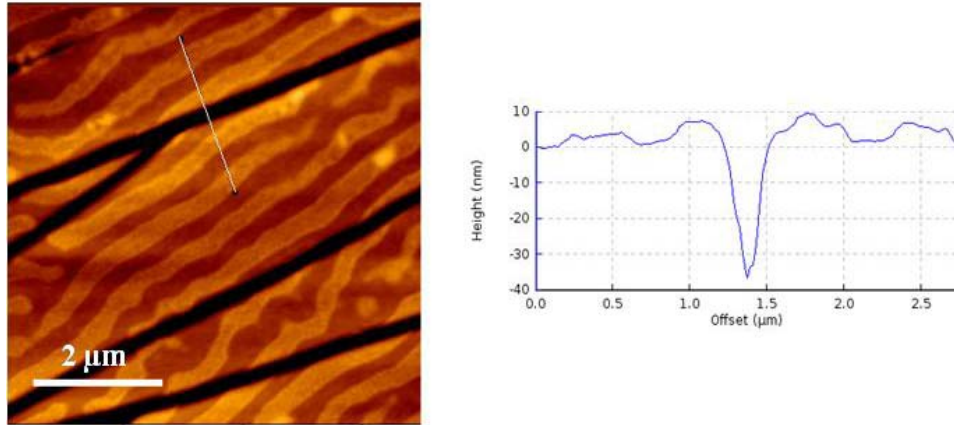


Figure 4.1 : Image AFM (mode contact) d'un timbre en PDMS après traitement plasma. Il est possible de voir sur l'image les deux effets liés à la création de la couche d'oxyde : la compression due à la variation de température (ondulations : claires) et la relaxation de l'énergie de surface (craquelures : noires). Il est possible de voir que les ondulations ont une amplitude inférieure à 10 nm et que les craquelures ont une profondeur au moins supérieure à 40 nm. Il est à noter que cette image a été réalisée avec un timbre soumis à un léger traitement plasma (20 s, 200 W).

Ces déformations physiques ont été étudiées dans la plupart des cas pour fabriquer une surface super-hydrophobe¹³ (grâce à l'étalement de fluorocarbène juste après le traitement), mais très peu de travaux¹⁴ ont démontré la possibilité d'utiliser ces déformations spontanées pour le dépôt structuré de molécules. De plus, dans la majorité des études, les timbres étaient préalablement structurés à l'échelle micrométrique ou nanométrique^{7,15}, soumis à des contraintes¹, chauffés avant le traitement⁵ ou refroidis après⁵ dans le but d'orienter les ondulations ou d'exacerber les variations de contractions entre le PDMS et la couche d'oxyde. Dans la suite de cette partie, nous verrons tout d'abord les déformations à la surface du timbre en PDMS engendrées par le traitement plasma, puis les résultats obtenus lors de la structuration d'un film de dendrimères par ce même timbre à la surface d'un substrat, par lithographie douce. En effet, avec un timbre en PDMS plat, c'est-à-dire non structuré, soumis à un léger traitement plasma oxygène, il est possible de structurer une surface à l'échelle submicronique. Le motif de dendrimères déposé par lithographie douce est capable de diffracter la lumière. Le principe de l'expérience est expliqué sur la figure 4.2.

Un traitement plasma oxygène est effectué sur un timbre afin de générer des ondes ordonnées, de tailles submicrométriques, à sa surface (étapes B et C). Le plasma utilisé ici,

tout comme au chapitre II, est un plasma micro ondes. Le traitement plasma ayant aussi pour effet de changer la mouillabilité de la surface, le timbre traité est donc hydrophile et structuré topographiquement. Le PDMS est ensuite encre avec une solution de dendrimères PAMAM (étape D), séché rapidement sous flux d'azote puis déposé sur une lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde (étape E). Après 1 minute 30, le timbre est enlevé et il est alors possible d'apercevoir sur la surface, une fine couche de dendrimères reproduisant les motifs observés à la surface du timbre après traitement plasma.

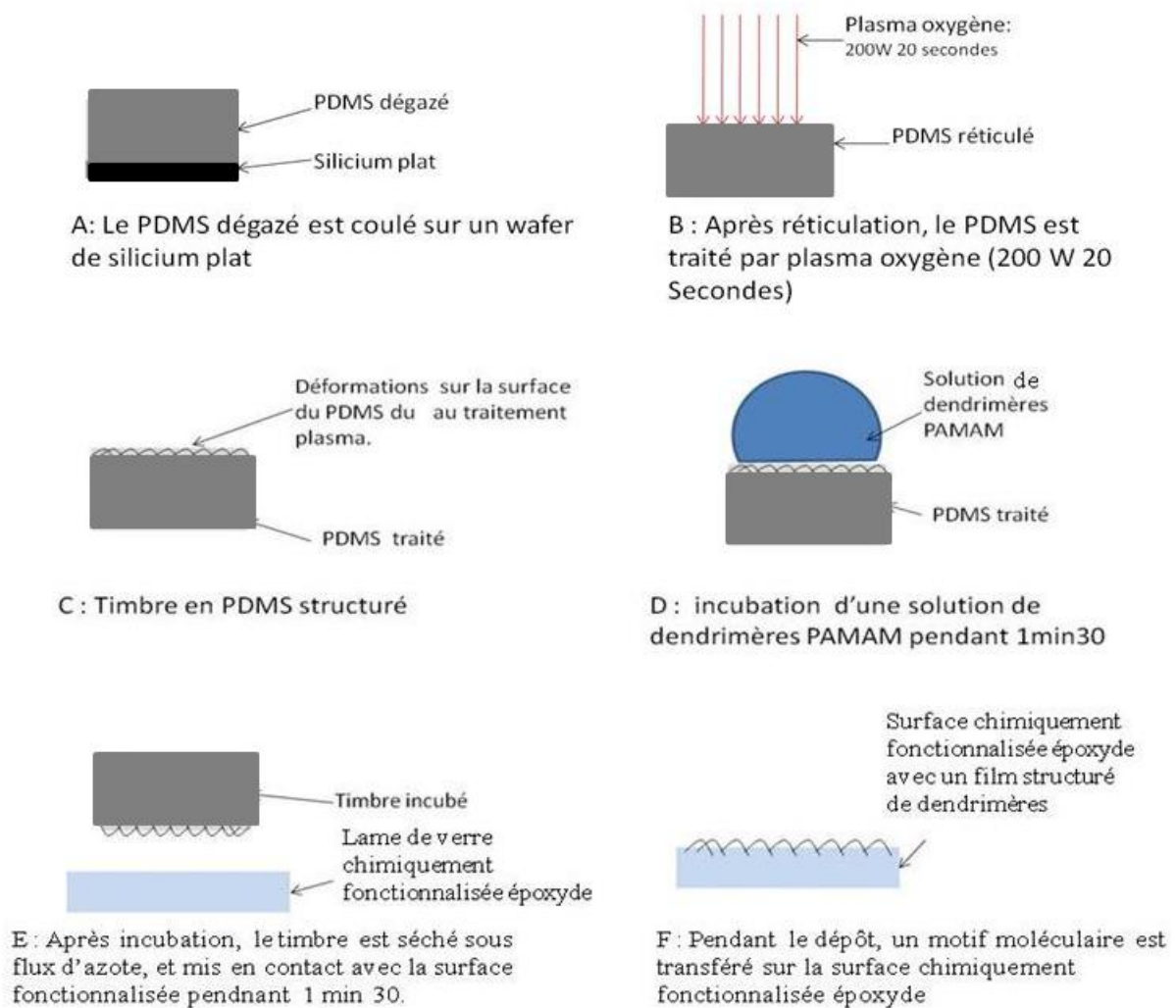


Figure 4.2 : Principe de la structuration spontanée d'un timbre plat en PDMS par action d'un plasma oxygène, et son utilisation pour structurer des dendrimères sur des surfaces par lithographie douce.

Plusieurs expériences ont été nécessaires afin de trouver les bonnes conditions expérimentales, tant au niveau du timbre (taille, épaisseur) que du traitement plasma (puissance, temps). Les phénomènes d'ondulations et de craquelures se produisant tous les deux durant le traitement, il a fallu trouver un compromis entre l'amplitude des ondulations et la densité des craquelures. Comme ces dernières risquaient d'abîmer les ondulations à la surface du timbre, et donc les dépôts de molécules réalisés avec, différents paramètres du plasma ont été étudiés afin de trouver les conditions optimales pour avoir une amplitude assez prononcée mais avec peu de craquelures. L'évolution des défauts en fonction de la puissance du plasma est reportée sur la figure 4.3.

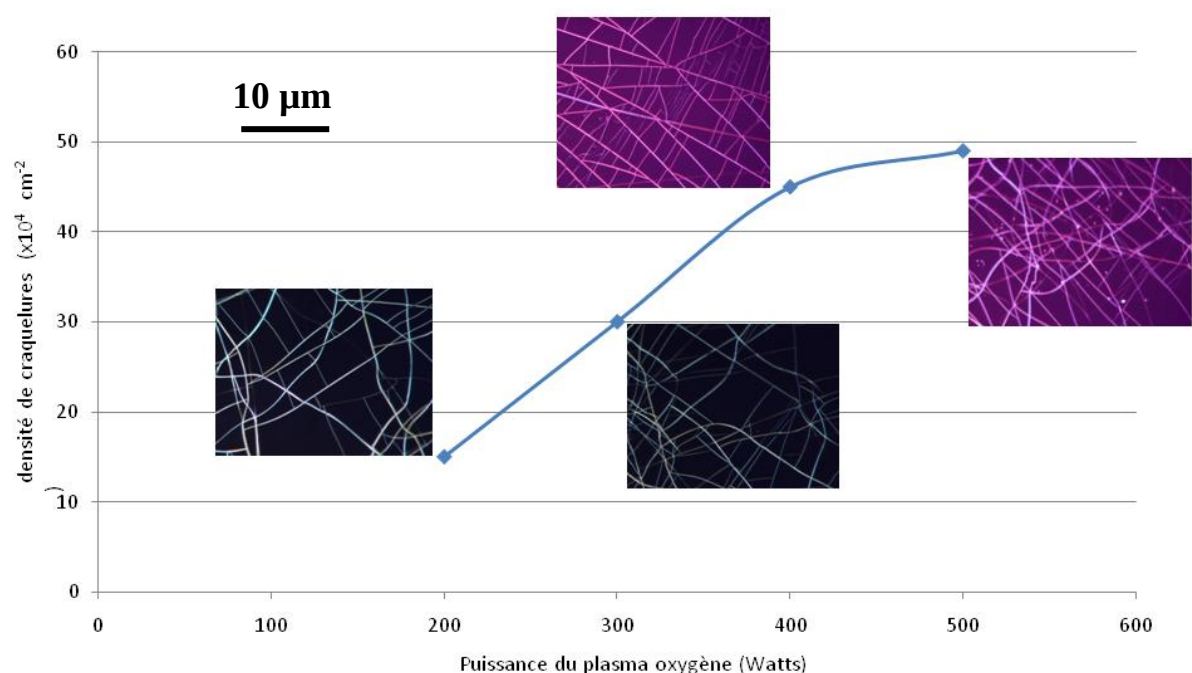


Figure 4.3 : Graphique représentant l'évolution de la densité de craquelures en fonction de la puissance du plasma oxygène lors d'un temps d'exposition constant de 20 secondes.

Le temps d'exposition choisi a toujours été 20 secondes, mais la puissance du plasma a varié de 200 à 500 watts. Le temps a été fixé car, au-delà de 20 secondes, selon la puissance choisie, le PDMS était endommagé voire inutilisable. Comme nous pouvons le voir sur les images en champ sombre, un plasma de 400 W ou 500 W provoque une densité de craquelures trop importante ($\text{plus de } 40.10^4 \text{ cm}^{-2}$) pour que le timbre puisse être utilisé en lithographie douce. Bien que l'amplitude des ondulations obtenue à 300 W soit supérieure à celle de 200 W, les craquelures restent deux fois plus nombreuses. Des tests ont aussi réalisés

avec un plasma à 100 W. La densité de craquelures était faible mais les ondulations n'avaient pas une assez grande amplitude pour que le timbre puisse être utilisable en lithographie douce. Un traitement à 200 W permet d'avoir peu de craquelures et des ondulations à la surface du PDMS de 10 nm d'amplitude, ce qui rend le dépôt par lithographie douce difficile mais possible. C'est donc le meilleur compromis, entre l'amplitude des ondulations et la densité de craquelures.

Plusieurs autres expériences ont été conduites en changeant deux paramètres expérimentaux du timbre : épaisseur et taille, mais en gardant toujours le même traitement plasma (200 W, 20 s). Par souci de concision, seule la conclusion des résultats de ces tests sera présentée. La taille optimale trouvée pour des timbres est un carré de 1cm² avec une épaisseur inférieure à 500 μm . Un exemple typique d'un timbre ayant les bonnes dimensions, traité au plasma dans les bonnes conditions peut être observé sur la figure 4.4. Les ondulations ont une amplitude de 10 nm, pour une période de 500 nm avec une largeur d'ondulation proche de 350 nm. Ce résultat concorde avec les travaux des différentes équipes sur l'ondulation du PDMS^{4,5}.

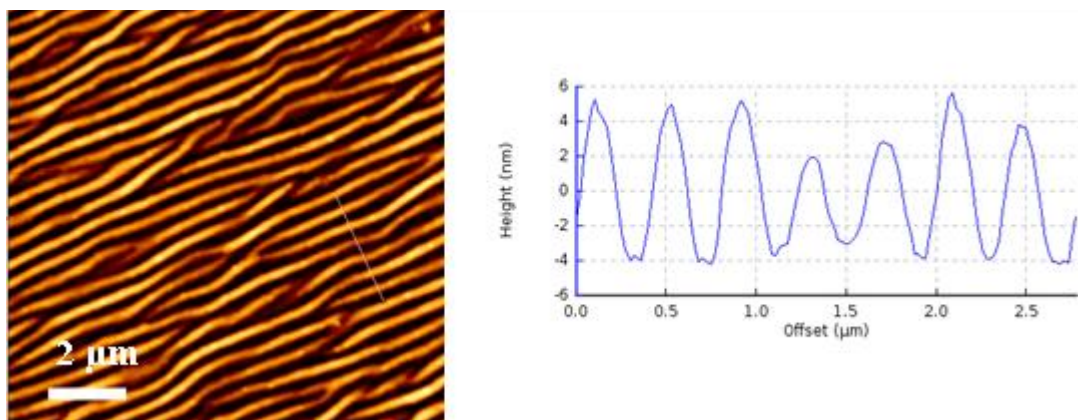


Figure 4.4 : Image AFM (mode contact) d'un timbre en PDMS traité au plasma O_2 (200 W, 20 sec). Il est possible de voir que les ondulations ont une amplitude de 10 nm, pour une largeur de 300 nm avec une période de 500 nm.

Les conclusions tirées de ces expériences ont permis de trouver les conditions optimales afin d'élaborer un timbre ondulé à l'échelle nanométrique par traitement plasma tout en maintenant la densité de craquelure en deçà d'un seuil compatible avec l'utilisation de ce timbre en lithographie douce. Dans la partie suivante, nous allons voir les résultats de

structuration de surface obtenus en utilisant un timbre traité au plasma suivant les conditions optimales et une solution de dendrimères PAMAM.

IV-1-2 : Le transfert de dendrimères par lithographie douce

Ayant trouvé les bonnes conditions expérimentales, nous avons pu utiliser des timbres traités afin de structurer des molécules par lithographie douce. Le but de ces expériences était de savoir si des structures topographiques sur le timbre, inférieures à 10 nm de hauteur, étaient compatibles avec le transfert de molécules. Les dendrimères, qui sont des macromolécules synthétiques (II-3-1), sont connus pour avoir de nombreuses ramifications dont le nombre et la fonction chimique sont contrôlables¹⁶. Les dendrimères de génération 4 qui ont été utilisés pour ces expériences, possèdent 96 ramifications (II-3-1) toutes aisément accessibles. Ce nombre élevé de sites rend les dendrimères très réactifs avec la surface. Un autre avantage des dendrimères est leur polyvalence : il a en effet été prouvé qu'il était possible d'avoir 2, 3 voire 4 fonctions différentes en surface, permettant la fixation de plusieurs substances actives possédant différentes propriétés¹⁷. De plus, les dendrimères peuvent aussi être utilisés en tant qu'agent d'encapsulation. En effet, leurs cavités internes leur permettent de piéger des molécules, comme des catalyseurs par exemple. Dans ce dernier cas, le dendrimère est capable d'avoir un effet positif ou négatif sur la catalyse, selon la structure du dendrimère, l'emplacement du catalyseur, le type de réaction catalytique¹⁸. Comme expliqué au II-4-2, notre choix s'est porté sur les PAMAM, molécules hydrophiles, pour leur structure largement connue¹⁶ et leur grande commercialisation. Ces dernières étant fonctionnalisées amine, c'est une surface chimiquement fonctionnalisée époxyde qui a été choisie, permettant une liaison covalente avec les amines¹⁹ (Fig. 2.26 dans le chapitre II-3-2).

Plusieurs expériences seront décrites ci-après, avec pour chacune des conditions expérimentales différentes. En effet, afin de comprendre le phénomène et de tester ses capacités et ses limites, nous avons fait varier divers paramètres comme la concentration de la solution ($[C]$ allant de 7 nM à 700 nM), le solvant (éthanol ou eau) des dendrimères, ou encore le substrat (verre non traité ou verre fonctionnalisé époxyde). Nous allons à présent voir quelques uns des résultats obtenus par ces expériences.

Comme expliqué sur la figure 4.2, après un encrage relativement court et un séchage rapide, le timbre a simplement été posé sur la surface, sans pression extérieure. Un exemple

de structuration par lithographie douce de dendrimères PAMAM, réalisée avec un timbre traité peut être observé sur les figures 4.5 et 4.6.

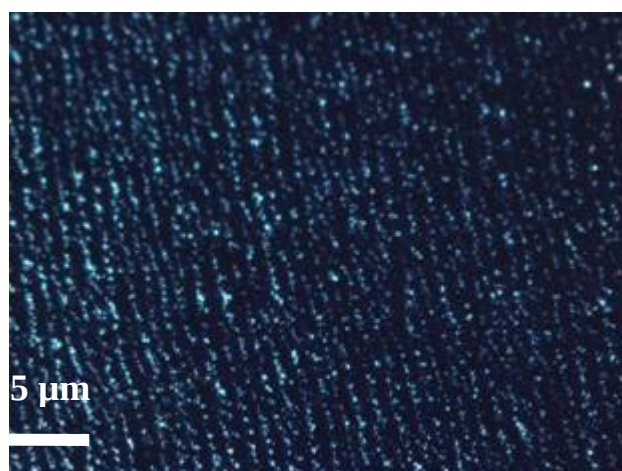


Figure 4.5: Image en champ sombre d'une lame fonctionnalisée époxyde, structurée par lithographie douce avec des dendrimères PAMAM ($[C] = 700 \text{ nM}$ dans l'éthanol) à l'aide d'un timbre en PDMS traité au plasma oxygène.

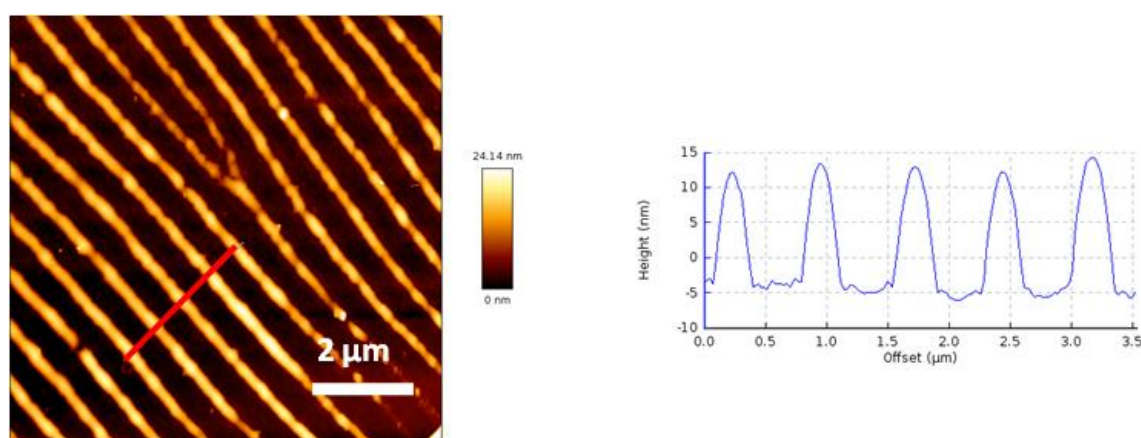


Figure 4.6 : Image AFM (mode contact) d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 700 \text{ nM}$ dans l'éthanol) sur une lame chimiquement fonctionnalisée époxyde, structurée par lithographie douce avec un timbre traité au plasma oxygène (200W, 20s). Le profil à droite correspond à la ligne rouge sur l'image AFM.

Sur les deux figures, nous pouvons voir des lignes de dendrimères structurées par lithographie douce. La figure 4.5 est une image en champ sombre qui nous renseigne sur la taille du dépôt réalisé : il a lieu sur toute la surface du substrat qui entre en contact avec le

timbre. Afin d'avoir une meilleure analyse topographique, des images AFM des dépôts ont été réalisées. Il ressort de ces images l'amplitude ainsi que la période des dépôts de dendrimères. En effet, en regardant la coupe (à droite sur la figure 4.6), nous pouvons voir que l'épaisseur des lignes de dendrimères varie de 15 à 20 nm, ce qui correspond à 3 ou 4 couches de dendrimères PAMAM G4, pour une largeur proche de 200 nm. Ces lignes sont répétées selon une période de 550nm.

Après les premiers tests, nous avons mené d'autres expériences en changeant la concentration. Des dépôts avec des solutions de 70 nM et de 7 nM ont été réalisés. La figure 4.7 est une image AFM d'un dépôt réalisé avec une solution de dendrimères de concentration 7 nM. La hauteur des lignes est ici inférieure à 10 nm ce qui correspond à 1 ou 2 couches de dendrimères. En observant la coupe, nous pouvons voir que les lignes sont composées de petit amas de dendrimères d'environ 6 nm.

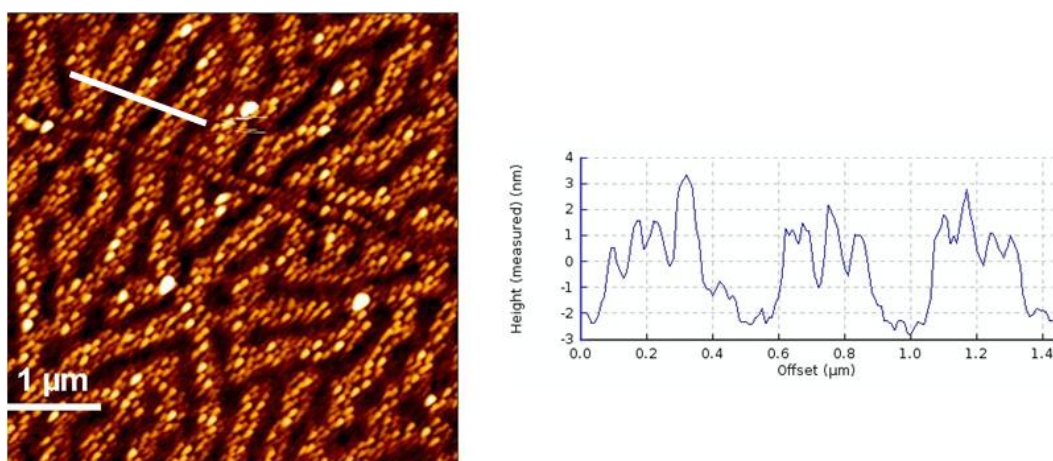


Figure 4.7 : *Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 7$ nM dans l'éthanol) sur une lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde, structurée par lithographie douce avec un timbre traité au plasma oxygène. Les lignes sont composées de petit amas de dendrimères d'une épaisseur maximale de 6 nm.*

Après avoir fait varier la concentration, nous avons changé le solvant des dendrimères. Dilués en premier lieu dans l'éthanol, nous en avons changé pour de l'eau. Il s'est avéré qu'avec ce nouveau solvant, nous pouvions toujours observer la structuration d'un film de dendrimères sur le substrat. La figure 4.8 est une image AFM d'un dépôt de dendrimères dilués dans l'eau, réalisé par lithographie douce.

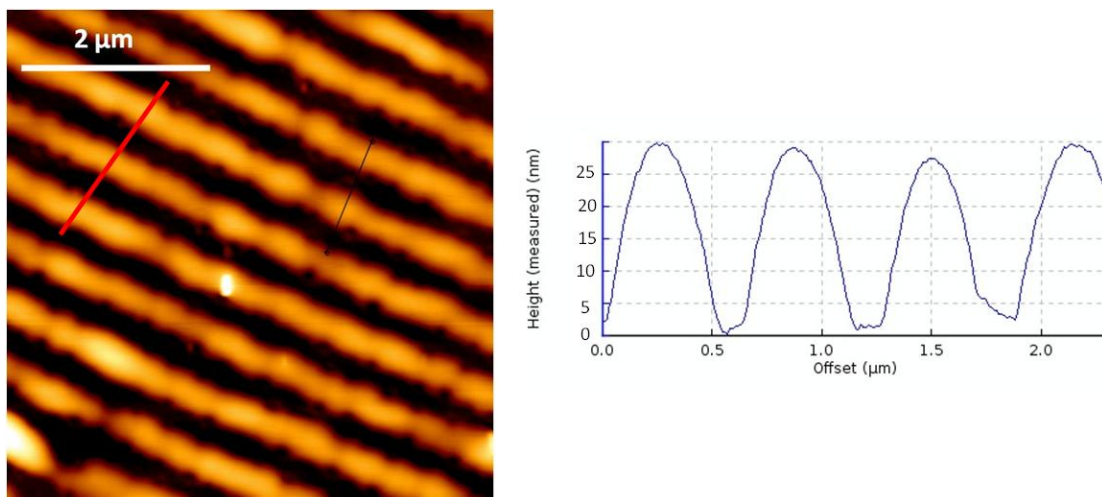


Figure 4.8 : *Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 700 \text{ nM}$ dans l'eau) sur une lame de verre chimiquement fonctionnalisée époxyde, structurée par lithographie douce avec un timbre traité au plasma oxygène. La hauteur des lignes est de 30 nm et la période de 500nm.*

Les dernières expériences que nous avons réalisées, ont eu pour but d'observer le comportement d'un dépôt en changeant le substrat. Nous avons donc remplacé la lame de verre fonctionnalisée époxyde par une lame de verre non traitée. Le résultat d'un dépôt sur une lame de verre non traitée fait avec un timbre plat passé au plasma, puis encré avec une solution de dendrimères dilués dans l'éthanol ($[C] = 700 \text{ nM}$) peut être observé sur la figure 4.9.

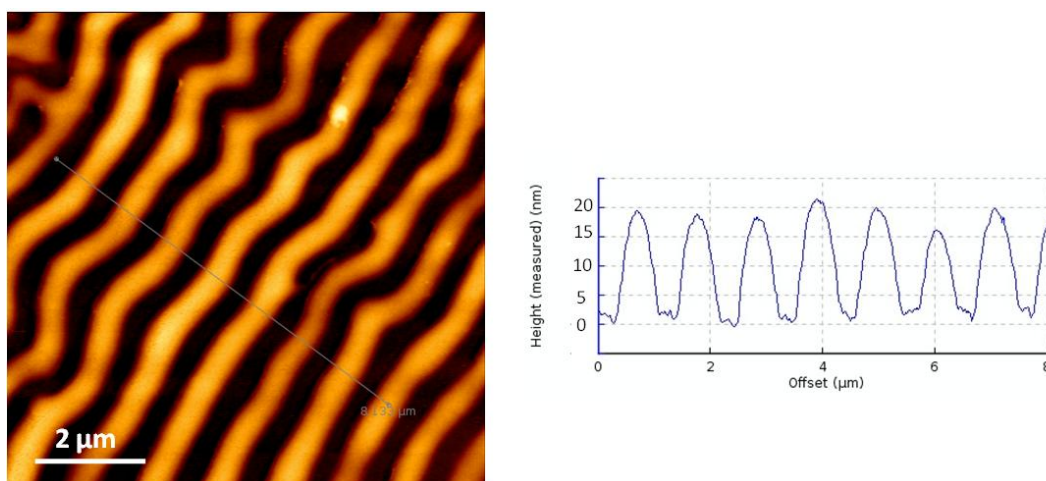


Figure 4.9 : Image AFM (mode contact) et coupe d'un dépôt de dendrimères PAMAM ($[C] = 70 \text{ nM}$ dans l'éthanol) sur une lame de verre non traitée, structurée par lithographie douce avec un timbre traité au plasma oxygène.

Nous obtenons donc le même résultat, soit des lignes de dendrimères se répétant selon un motif proche d'un réseau de lignes. En effet, nous pouvons observer sur la figure 4.9, les mêmes types de motifs que pour une lame de verre fonctionnalisée époxyde. La hauteur de lignes de dendrimères est ici proche de 20 nm, ce qui correspond à 4-5 couches de dendrimères PAMAM G4 utilisés.

Durant nos études AFM, nous avons réalisé des analyses statistiques de la rugosité de la surface. Nous avons obtenu diverses rugosités selon l'endroit étudié. La rugosité des lignes de dendrimères était en moyenne de 1,4 nm, lors du dépôt à une concentration de 700 nM. C'est une rugosité typique d'une fine couche de dendrimères. La rugosité entre les lignes était inférieure à 1 nm, mais cependant plus élevée que la rugosité typique du substrat avant dépôt. Nous avons donc 3 types de rugosités différentes entre le substrat vierge, le dépôt de dendrimères (les lignes) et les espaces entre les lignes de dendrimères. Ces analyses semblent donc indiquer qu'un matériau se soit déposé entre les lignes de dendrimères.

La dernière série d'expérience portait sur la capacité du timbre dans le temps à structurer des dendrimères sur un substrat. Nous avons donc traité plusieurs timbres au plasma O_2 (200 W, 20 s). Nous en avons utilisé une partie de suite après le traitement pour structurer un substrat avec des dendrimères, et nous avons gardé l'autre partie pour des tests réalisés 24 à 48 h après. En utilisant un timbre 24h après le traitement, nous avons obtenu les mêmes

résultats qu'avec un timbre utilisé juste après avoir été exposé au plasma. Nous avons réussi à obtenir un dépôt semblable à ceux observés jusqu'à présent. Il est à noter que 24h après le traitement, le timbre présentait toujours un caractère hydrophile. Afin de tester la capacité du timbre à structurer une surface dans d'autres conditions, nous avons attendu que le timbre recouvre une partie de son hydrophobicité. 48h après le traitement, l'angle de contact entre une goutte d'eau et le PDMS était de 74°. L'hydrophobicité du timbre en partie retrouvée, nous avons vérifié par AFM la présence des ondulations sur la surface du PDMS. Nous avons ensuite encre le timbre puis nous l'avons déposé sur un substrat selon les mêmes conditions expérimentales que précédemment, sans toutefois réussir à obtenir un motif quelconque sur le substrat. Il s'avère donc que le transfert de dendrimères à l'aide d'un timbre en PDMS structuré par plasma, n'est possible que lorsque les deux conditions sont réunies : des ondulations en surface et une grande hydrophilicité.

Interprétation

Un timbre fin en PDMS, soumis à un traitement plasma O₂, peut développer, dans les bonnes conditions de plasma (200 W 20 s), des ondulations sans nécessairement avoir une haute densité de craquelures. Les ondulations que nous avons observées sur les timbres utilisés avaient une amplitude de 10 nm pour une période de 500nm. Malgré la faible amplitude des ondes, il s'est avéré possible de structurer une surface avec des dendrimères PAMAM avec un timbre plat traité au plasma O₂. Le motif que nous avons obtenu, en utilisant le timbre « auto-structuré », était proche d'un réseau de lignes de dendrimères ayant pour dimensions, celles du motif sur le timbre. Cependant, avec l'AFM il est impossible de savoir si les dendrimères se sont déposés selon les creux ou selon les bosses des ondulations. Nous ne pouvons donc pas dire s'il s'agit d'un phénomène de dépôt ou de moulage. Selon les calculs et les expériences menés par Bietsch et al.²⁰, l'amplitude des ondulations sur le timbre après traitement plasma ne serait pas assez élevée pour prévenir d'un contact entre l'ensemble du timbre et l'échantillon. De plus, les forces d'adhésion entre le PDMS traité (très hydrophile) et la surface (hydrophile aussi) étant très élevées (le timbre se retrouve presque collé à la surface : II-2-1-b), elles peuvent induire un effondrement du timbre (II-2-2). Cette hypothèse privilégie un phénomène de moulage. D'autres résultats concordent avec cette hypothèse. Premièrement, lors du changement de concentration, les résultats sont différents pour une concentration faible ou élevée (Fig. 4.6 et 4.7 et 4.8). En effet, à concentration faible (Fig. 4.7), l'épaisseur de dendrimères est deux fois moins importante qu'à une concentration

100 fois plus élevée. Ce type d'observation a été réalisé par C. Thibault et al.²¹ dans le cas d'un μTm de dendrimères en utilisant un timbre en PDMS pré-structuré. De plus, la différence de rugosité entre les différentes parties du dépôt (lignes/creux), elles mêmes différentes de la rugosité du substrat, laisse penser au dépôt d'un matériel dans les creux. Lors de l'encrage du timbre (après traitement), une fine couche de dendrimères se répartit sur l'ensemble du timbre. Ceci est dû à la grande hydrophilicité du PDMS et des dendrimères PAMAM. Lors de la mise en contact sur le substrat, la grande affinité entre le PDMS traité et la surface fonctionnalisée époxyde tend à « coller » le timbre sur le substrat. Les dendrimères se retrouvent donc expulsés du sommet des ondulations dans les cavités. Ce procédé ne peut cependant avoir lieu que lorsque le timbre est hydrophile et donc très réactif avec la surface. Ceci est confirmé par la dernière série d'expérience qui a montré que la structuration du substrat est impossible si le timbre est de nouveau hydrophobe, et cela malgré la présence des ondulations sur sa surface. Nous avons pour l'instant tous les éléments pour pencher en faveur du moulage. Cependant, l'épaisseur des lignes de dendrimères sur le substrat est supérieure à l'amplitude des ondulations sur le timbre. Ceci peut être expliqué par une déformation du timbre lors du transfert des dendrimères dans les cavités au moment du dépôt. En effet, l'interaction entre le PDMS et le substrat est si forte lors du contact que le PDMS se retrouve déformé par l'arrivée des dendrimères. Cette hypothèse est confirmée par deux points : premièrement, le même phénomène est retrouvé dans les craquelures (Fig. 4.7), avec un transfert de dendrimères de la craquelure sur le substrat. Deuxièmement, il existe deux types de rugosité dans le dépôt : la rugosité des lignes de dendrimères, et la rugosité des creux égale ni à celle des lignes, ni à celle du substrat vierge. Nous posons l'hypothèse, que cette rugosité provient de morceaux de PDMS laissés sur la surface lors de l'enlèvement du timbre. En effet, plusieurs équipes ont déjà montré que les forces d'interaction entre du PDMS traité par plasma et une surface étaient importantes au point de créer des liaisons covalentes^{22,23}. Pour finir, le processus de moulage correspond au résultat trouvé au chapitre II-4-2, qui donnait des résultats inversés (dépôt/moulage) selon le traitement du timbre.

Conclusion

Habituellement, lorsque l'on souhaite structurer un substrat avec des motifs à l'échelle nanométrique par lithographie douce, il faut d'abord fabriquer par lithographie électronique, un moule en silicium contenant ces motifs. La technique que nous avons exposé à travers cette première partie, rendrait possible la structuration d'un substrat à l'échelle nanométrique,

à l'aide de dendrimères, sans avoir à recourir à la lithographie électronique. En effet, un traitement plasma O_2 engendre des ondulations qui peuvent être utilisées dans le but de structurer une surface. La variation de différents paramètres expérimentaux tels que la concentration de la solution, le solvant, ou encore le substrat nous indique que ce processus n'est pas particulier à un type de solvant ou un type de chimie de surface. D'autres équipes ont déjà travaillé sur ce sujet, et ont obtenu des résultats différents¹⁴. Dans le cas de Praelitz et al, le phénomène impliqué est un processus de dépôt et non pas de moulage. Cependant, l'amplitude des ondulations du timbre supérieure à 40 nm rend possible ce processus. Nos amplitudes étant seulement de 10 nm, c'est par moulage que nous structurons le substrat. Plusieurs points participent à l'élaboration de cette hypothèse : variation de l'épaisseur des molécules déposées selon la concentration, rugosité de la surface, interaction entre le PDMS et le substrat, dépôt de dendrimères selon des craquelures.

IV-1-3 : Possibilités offertes

Nous avons donc vu la possibilité de structurer, sur différentes surfaces, des dendrimères dilués dans différents solvants. Sans avoir recours à la lithographie avancée, nous sommes donc en mesure de générer sur une surface un réseau de molécules, à l'échelle nanométrique. Des tests préliminaires de diffraction ont été réalisés avec ces dépôts. Le réseau de lignes diffracte la lumière, mais cependant aucune figure de diffraction ne sera montrée car elles sont trop larges pour être mesurées. En effet, à l'œil nu, il est possible de voir une tache dont le diamètre est proche de 2 mm. Bien que l'ordre 1 soit dispersé, ces premiers tests de diffraction sont encourageants pour la suite, dans le cas où il y aurait une meilleure maîtrise des dépôts.

La technologie n'est évidemment pas encore assez maîtrisée pour être réellement utile au milieu industriel. En effet, même si une figure de diffraction apparaît lorsque le réseau est éclairé, elle est assez large, et il serait nécessaire de mesurer cette intensité avant et après interaction dans le but de savoir s'il est ou non possible de détecter une interaction et quel type d'interaction, c'est-à-dire quelle sensibilité de détection. De même il serait utile de faire des tests afin de s'assurer de la spécificité des interactions. Les simulations de Jean-Christophe Cau étant basées sur le principe que le réseau possède un pas de 1 μm , les calculs devraient être refaits, car notre pas est ici de 500 nm.

Dans l'introduction nous avons parlé de deux techniques qui permettraient d'améliorer la biopuce. Nous allons à présent voir la deuxième technique qui permettrait d'élargir le panel de molécules détectées. En effet, la détection est pour l'instant confinée à l'étude d'interactions entre brins d'ADN, entre protéines ou au criblage pharmaceutique. Les molécules sur lesquelles nous avons travaillées, les polymères à empreintes moléculaires (MIP), permettraient de détecter de nombreux autres types d'interactions.

IV-2 : Une autre possibilité : les Polymères à Empreintes Moléculaires.

La couche biologique sensible qui est composée par

- les sondes, responsables de la fixation de la cible (ou analyte),
- la chimie de surface (ou couche d'immobilisation) qui permet une bonne fixation des sondes,

est la clef de la spécificité de la reconnaissance biologique. Nous avons vu que la chimie de surface dépendait des sondes choisies, dépendantes elles-mêmes des molécules que l'on cherche à détecter. Il existe différents types de sondes : naturelles ou synthétiques. Celles que nous avons vues jusqu'à présent faisaient partie de la catégorie naturelle. Les sondes naturelles ont l'avantage d'être plus spécifiques et plus affines que certaines sondes synthétiques. Cependant, à cause des conditions d'utilisation et de conservation contraignantes (pH, stabilité thermique, conservation dans le temps ...), elles ont des capacités limitées. Afin de résoudre une partie de ces problèmes, des sondes synthétiques ont été récemment développées. Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) représentent une forme de ces sondes synthétiques. Les expériences qui seront décrites ci-après, ont été réalisées en collaboration avec Cédric Ayela du LAAS-CNRS et Karsten Haupt de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC). K. Haupt nous a fourni des MIP spécifiques pour la molécule dansyl-L-phénylalanine (et leur contrôle négatif les NIP (polymères non imprimés)), MIP développés préalablement au sein de son équipe à l'UTC. Leur chimie est basée sur l'utilisation d'acide méthacrylique (MAA) comme monomère fonctionnel et du Triméthylolpropane triméthacrylate (TRIM) comme réticulant. Le solvant utilisé est le Diéthylène glycol diméthyl ether (diglyme). Enfin, un agent co-porogène (PVAc 1%) a été rajouté pour favoriser l'accès aux molécules imprimées. Cet agent génère des macropores

dans le polymère permettant ainsi aux molécules d'accéder facilement aux empreintes du polymère dans le volume et non pas seulement en surface.

IV-2-1 : Présentation des MIP

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) miment le comportement des sondes naturelles en conservant une grande affinité et spécificité. Leur facilité de production en fait une technique générique. Ils possèdent de plus des propriétés fortes de stabilité et de robustesse dans des conditions sévères²⁴. Le principe d'un MIP, dont le cycle d'assemblage est observable sur la figure 4.10, consiste à créer dans un polymère synthétique, l'empreinte de la molécule que l'on souhaite étudier. Il est possible d'encapsuler des anticorps, des enzymes ou encore des petites molécules (herbicides, pesticides... molécules à faible poids moléculaire).

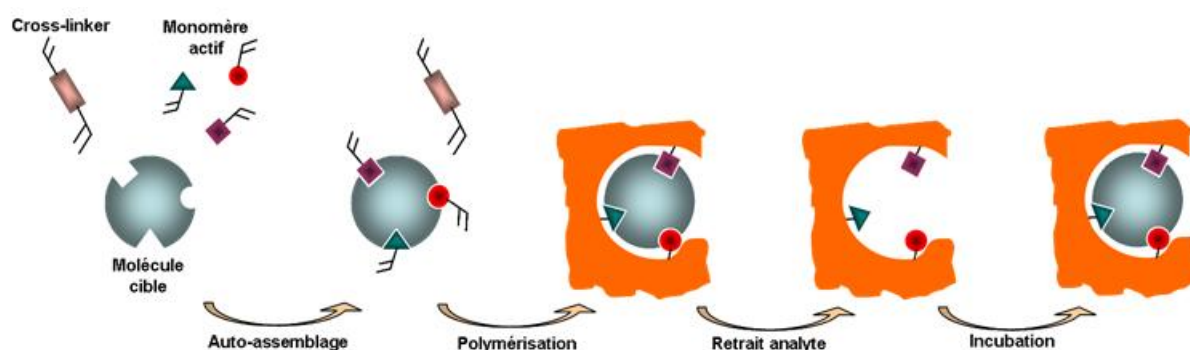


Figure 4.10 : Principe d'assemblage spécifique des polymères à empreinte moléculaire (MIP).

Comme le montre la figure 4.10, après l'auto-assemblage des molécules cibles et des monomères fonctionnels par des liaisons non-covalentes (l'assemblage par des liaisons covalentes est aussi possible, mais leur utilisation est moins fréquente), le complexe autoassemblé est polymérisé soit par irradiation sous UV, soit par des effets thermiques. Cette polymérisation a pour but d'emprisonner le complexe « molécule cible-monomères » dans une matrice polymérique qui devient alors le support et la structure du MIP. La molécule cible peut ensuite être retirée par coupure des liaisons non-covalentes puis insérée à nouveau dans le polymère caractérisé par une mémoire de la forme et une sélectivité des liaisons chimiques. Les deux dernières étapes, appelées cycles, peuvent être répétées sans perte de réactivité. Il est important de citer les travaux pionniers de K. Haupt et al. sur la combinaison de polymères à

empreintes moléculaires avec les microbalances à quartz²⁵, qui ont confirmés le potentiel de ces sondes dans le domaine des biocapteurs.

Jusqu'à présent le dépôt en couche mince des MIP a majoritairement été réalisé par des techniques telles que le spin-coating ou le dépôt localisé par robot²⁶. Ces méthodes ont prouvé qu'il y avait conservation du phénomène d'impression lors du dépôt²⁶. Cependant, dans le cadre de nos travaux, ces techniques se trouvent peu appropriées pour utiliser une technique de diffraction de la lumière puisqu'il y a impossibilité de structurer des motifs en réseaux périodiques. Des structurations par lithographie douce de MIP ont déjà été réalisées²⁷ mais jamais par les techniques de μ CP. Au vu du panel de molécules synthétisables avec les MIP, réussir à structurer par μ CP des MIP en réseaux de lignes permettrait d'avoir une gamme étendue de molécules à détecter. En effet, bien que la synthèse de MIP avec des protéines mérite encore d'être développée²⁸, à cause de la complexité des structures tridimensionnelles de ces dernières, les MIP sont déjà utilisés comme sondes pour des petites molécules dans de nombreux domaines comme l'analyse environnementale^{29,30} ou les applications thérapeutiques³¹.

Les MIP sont donc des molécules aptes à être utilisées comme récepteurs dans les biocapteurs. Dans notre cas, nous souhaitons structurer des MIP en réseaux afin de pouvoir les utiliser dans le cas d'un détecteur sans marquage par diffraction. Pour cela, nous avons vérifié la spécificité des polymères structurés par lithographie douce. Deux types de solution ont été utilisés : des MIP et des NIP. Le NIP, « polymère non imprimé », est le contrôle négatif du MIP. En effet, dans le cas du NIP, le polymère ne contient pas l'empreinte de la molécule cible, il est donc censé ne pas réagir, c'est-à-dire ne pas être modifié, lors de l'étape d'incubation.

Dans la suite de cette partie, nous allons voir les résultats obtenus sur la structuration de MIP et de NIP par μ CP.

IV-2-2 : Structuration de MIP par lithographie douce.

Les premières expériences que nous avons réalisées ont été effectuées avec des timbres non traités. Les résultats obtenus dans ces conditions ont été très peu concluants à cause du caractère hydrophile des MIP et donc à la difficulté d'encrer les timbres et de transférer les mélanges de prépolymérisation sur la surface. Nous avons donc décidé, comme dans le cas

des dendrimères au chapitre II (II-4-2), de traiter les timbres au plasma O_2 afin de les rendre hydrophiles et donc de faciliter l'encrage tout d'abord (la solution s'étale plus facilement sur une surface hydrophile), mais aussi la structuration des MIP. Par la suite, tous les timbres utilisés ont été traités au plasma O_2 à une puissance de 200 Watts durant 20 secondes afin de permettre une structuration satisfaisante des MIP en réseaux. La plupart des timbres utilisés avaient pour motifs des réseaux ayant des lignes de 500 nm au pas de 1 μm , mais certains timbres ayant des lignes de 200 nm au pas de 1 μm ont aussi été employés (Fig. 4.11).

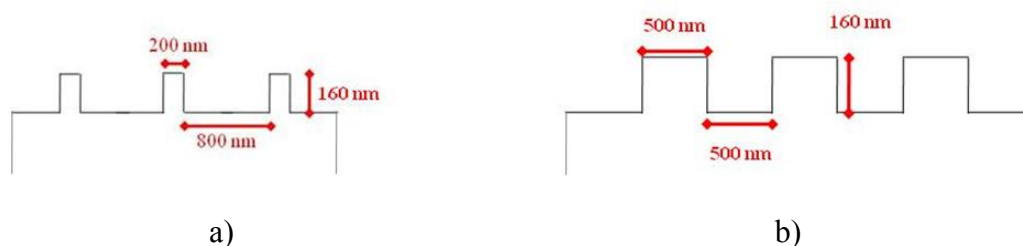


Figure 4.11 : Schéma des deux types de timbre utilisés durant les expériences sur les MIP

Les lames de verre, sur lesquelles les MIP ont été immobilisés, ont été fonctionnalisées avec un silane spécifique comportant les mêmes fonctions que le réticulant afin d'en faciliter la fixation. Le silane employé était le 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (Fig. 4.12).

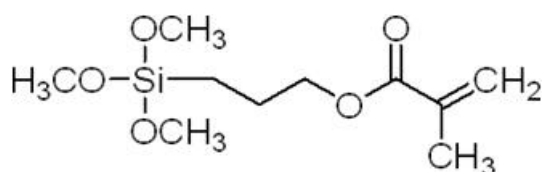


Figure 4.12 : Formule semi-développée du 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate.

La partie fonctionnelle méthacrylate (via la double liaison) va permettre la liaison avec le polymère, tandis que la base (triméthoxysilane) va servir à créer des liaisons avec le substrat, préalablement activé par un traitement plasma O_2 .

Lors des premiers tests, le protocole expérimental était le suivant :

1 : - timbre traité au plasma O_2 pendant 20 secondes à 200 Watts,

- 2 : - incubation de la solution de MIP sur le timbre pendant 5 minutes,
- 3 : - séchage rapide du timbre sous flux d'azote,
- 4 : - dépôt du timbre pendant 5 minutes sur la surface correctement silanisée pour accueillir les MIP,
- 5 : - l'ensemble timbre + support est placé dans une enceinte saturée d'azote durant 5 minutes avant d'exposer au rayonnement UV (365 nm) pendant 1h.
- 6 : - la surface structurée est lavée pendant une nuit dans une solution d'acide acétique 20% / éthanol 80%, pour nettoyer la surface et extraire les molécules empreintes du polymère structuré.

L'enceinte (étape 5) est saturée d'azote car la présence d'oxygène empêcherait la polymérisation. Il est à noter que l'étape 5 a subi diverses modifications avant de trouver la conformation optimum. En effet, des expériences ont été réalisées en laissant, ou non, le timbre en contact avec le support lors de la polymérisation. Il s'est avéré que les meilleurs résultats étaient obtenus en laissant le timbre en contact dans l'enceinte. Durant le reste de cette partie, les résultats présentés ont tous été réalisés par des timbres préalablement traités au plasma et laissés en contact sur la surface pendant la polymérisation.

Un exemple de structuration de MIP sur un substrat, réalisée dans les conditions expérimentales optimales, peut être observé sur l'image 4.13.

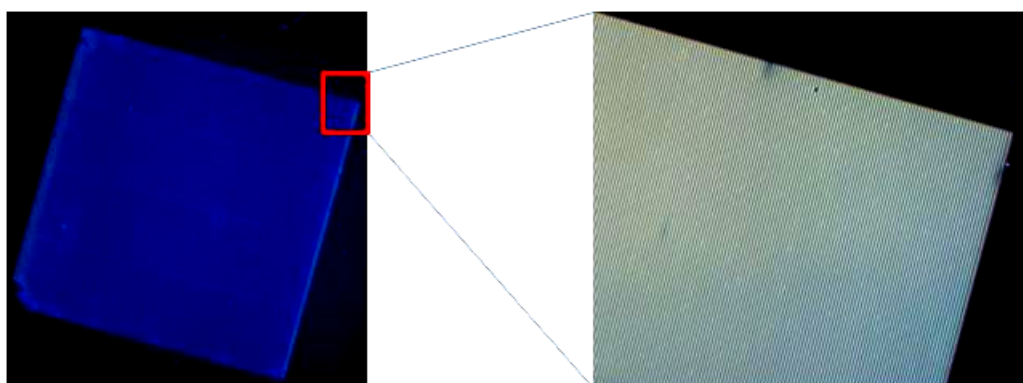


Figure 4.13 : *Images en champ sombre d'une structuration de MIP par lithographie douce réalisée avec un timbre traité au plasma O_2 .*

Cette structuration a été réalisée avec un timbre ayant des lignes de 500 nm de large au pas de 1 μm (timbre b sur la figure 4.11), traité au plasma oxygène. Le carré, sur l'image de gauche, représente une surface de 400*400 μm^2 , soit exactement la taille du réseau se trouvant sur le timbre. Le motif du timbre a donc été reproduit à l'identique sur toute sa surface. Plusieurs dépôts ont ainsi été réalisés avec des MIP et des NIP, avec les deux types de timbre (a et b sur la figure 4.11). Afin d'avoir une meilleure analyse topographique, des images AFM des réseaux de MIP ont été réalisées. Un exemple de structuration de MIP réalisée avec un timbre « a » peut être observé sur la figure 4.14.

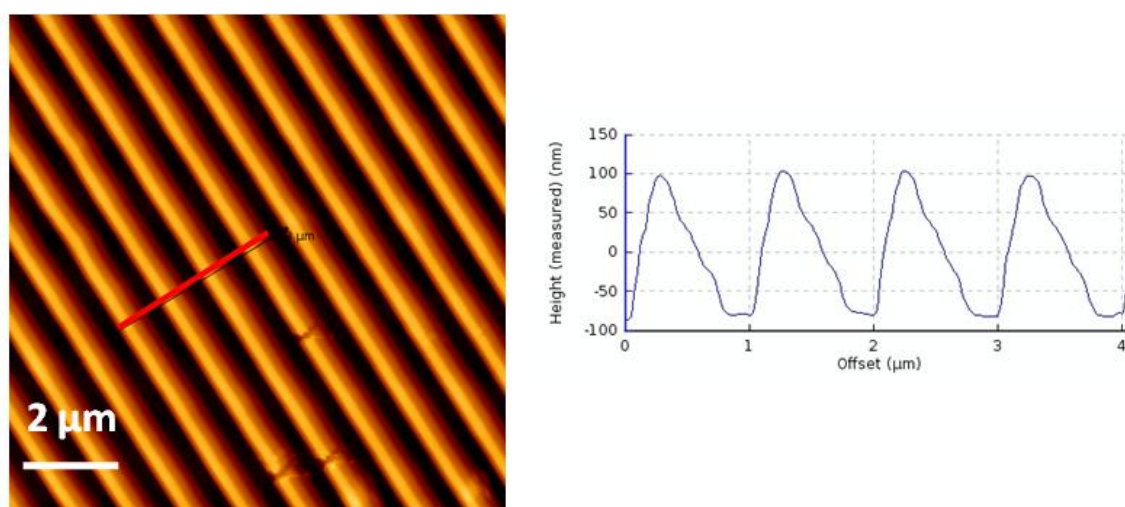


Figure 4.14 : Image AFM d'une structuration de MIP réalisée par lithographie douce à l'aide d'un timbre en PDMS « a » traité au plasma O_2 . L'image à droite représente la coupe d'une partie du réseau. Les lignes ont une largeur de 800 nm pour une hauteur de 200 nm.

En regardant la coupe, il est possible de voir que la hauteur des lignes est d'environ 200 nm, ce qui est plus épais que la profondeur du timbre (160 nm sur la figure 4.11). Il est aussi important de remarquer que les lignes ont une largeur de 800 nm, ce qui correspond à l'inverse des motifs saillants du timbre « a », mettant ainsi en évidence un transfert par moulage plutôt que par impression.

Au vu de l'utilisation que nous souhaitons en faire (utilisation pour la diffraction), il a été nécessaire de réduire l'épaisseur des lignes. Comme nous l'avons vu durant ce manuscrit, l'épaisseur est primordiale et doit être faible. Donc, dans le but de réduire la hauteur des lignes, nous avons essayé d'enlever le surplus de MIP restant sur le timbre après incubation. Pour retirer cet excédent de solution, nous avons décidé de passer un timbre plat sur le timbre

structuré (a ou b) après incubation et séchage. Cette étape, afin de simplifier l'écriture sera appelée étape de « nettoyage » du timbre structuré. Les images AFM 4.15 a et b représentent respectivement une structuration de MIP réalisée avec un timbre « b » non « nettoyé » et une structuration de MIP réalisée avec un timbre « b » « nettoyé » avant dépôt.

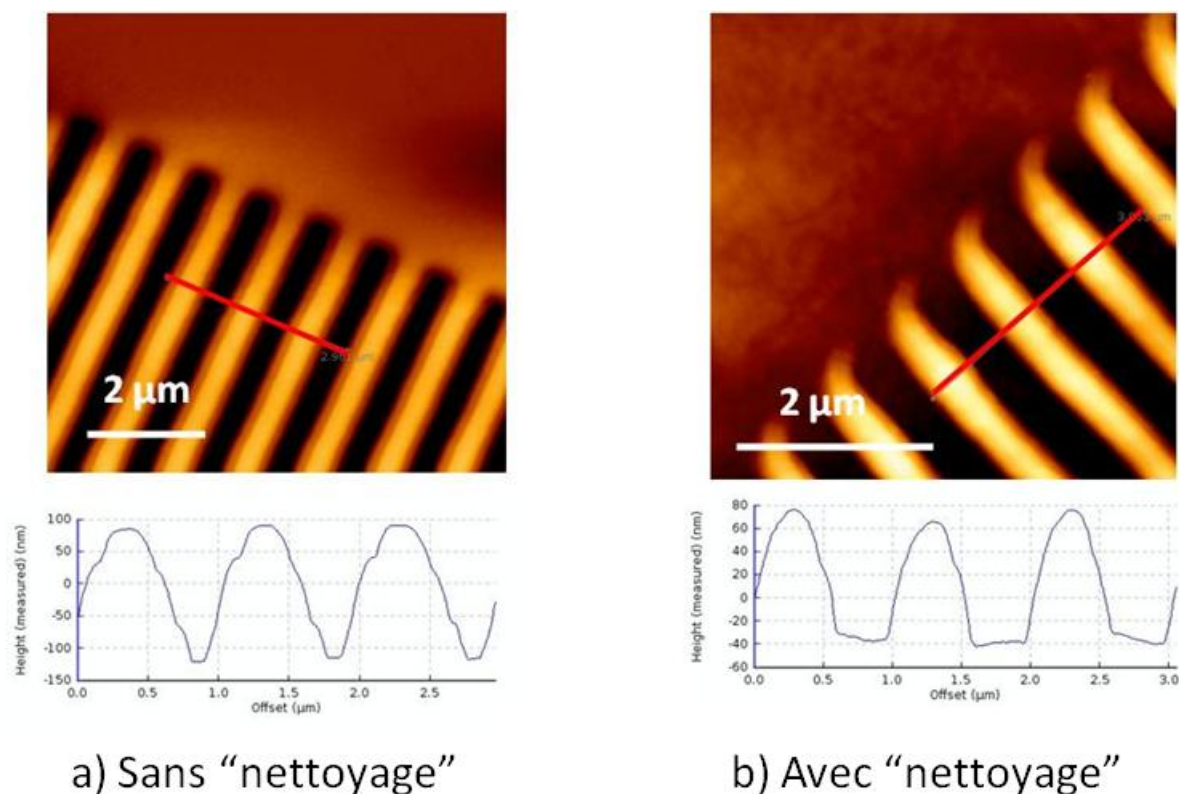


Figure 4.15 : a) Image AFM d'une structuration de MIP réalisée par lithographie douce à l'aide d'un timbre « b » en PDMS traité au plasma O_2 . Le profil est visible en dessous de l'image. Les lignes ont une largeur de 800 nm pour une hauteur de plus de 200 nm. b) Image AFM d'une structuration de MIP réalisée par lithographie douce à l'aide d'un timbre « b » en PDMS traité au plasma O_2 . Le timbre, dans ce cas ci, a été « nettoyé » à l'aide d'un timbre plat entre les étapes de séchage et de dépôt. Le profil est visible en dessous de l'image. Les lignes ont une largeur d'environ 500 nm pour une hauteur d'environ 120 nm.

L'épaisseur des lignes est plus faible lorsque le timbre est « nettoyé » à l'aide d'un timbre plat. En effet, les lignes, sans nettoyage, ont une hauteur de plus de 200 nm alors que les lignes, avec un timbre « nettoyé », ont une hauteur d'environ 120 nm. Les lignes structurées dans le cas a ont pour largeur 800 nm ce qui est plus large que les motifs creux du timbre (500 nm), contrairement au cas b, où les lignes ont une largeur d'environ 500 nm. Le

dernier point à remarquer est la surface en dehors des réseaux. En effet, à l'extrémité des lignes dans le cas a, nous pouvons voir qu'il n'y a pas de marche : les lignes sont continues avec le bord, ce qui veut dire qu'il n'y a pas de coupure nette entre la fin du réseau et le reste du dépôt. A l'inverse, lors de la structuration avec un timbre « nettoyé », les lignes se terminent et le reste du dépôt ne contient pas de MIP, tout du moins, ne contient pas une couche de MIP épaisse comme les lignes du réseau.

Afin de comprendre la structuration de la surface par les MIP, nous avons procédé à une étude en déflexion latérale. En effet, afin de savoir exactement où nous avons déposé les MIP (sur les lignes ? entre les lignes ?) nous avons étudié la déflexion latérale du bras de levier de l'AFM. L'étude de la déflexion latérale du bras de levier de l'AFM permet d'imager les variations des forces de frictions de la surface. Ces variations de force de frictions se produisent lorsque les surfaces ne sont pas, entre autre, chimiquement homogènes (Fig. 4.16).

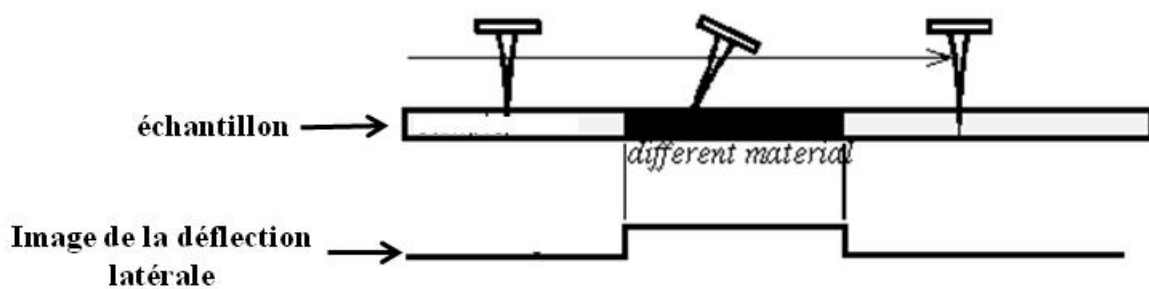


Figure 4.16 : Explication schématique de l'étude de la déflexion latérale du bras de levier de l'AFM lors de l'analyse d'un échantillon chimiquement inhomogène.

La déflexion latérale permet donc d'avoir une étude chimique des différentes parties de la surface. Sur les images AFM 4.17 (timbre non « nettoyé ») et 4.18 (timbre « nettoyé »), il est possible de voir la topologie (a) ainsi qu'une représentation de la chimie de surface (b).

Timbre non nettoyé

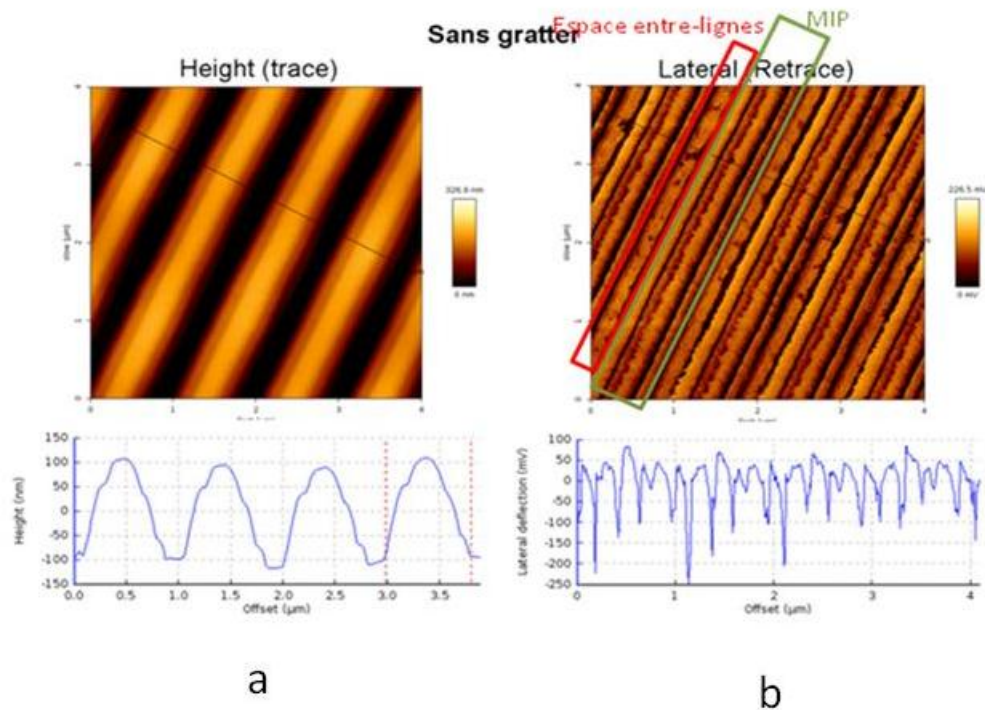


Figure 4.17 : Images AFM de a) topologie b) déflexion latérale d'une structuration de MIP réalisée à l'aide d'un timbre « b » en PDMS traité au plasma O_2 .

La représentation de la chimie de surface de la structuration de MIP réalisée avec un timbre non gratté, est assez complexe. En effet, en comparant avec l'image de topologie, il s'avère que les bandes noires (sur l'image 4.17 **a**) ne correspondent pas forcément à une chimie de surface uniforme (rectangle rouge « espace entre-lignes » sur la figure 4.17 **b**). Il en est de même pour les lignes de MIP (claires sur l'image 4.17 **a**) qui correspondent au rectangle vert (« MIP ») sur l'image 4.17 **b**. L'étude des profils de chaque image nous donne une hauteur de ligne d'environ 200 nm pour une largeur d'environ 800 nm. Le profil de l'image b contient au contraire des « bosses » d'environ 200 nm.

Timbre nettoyé

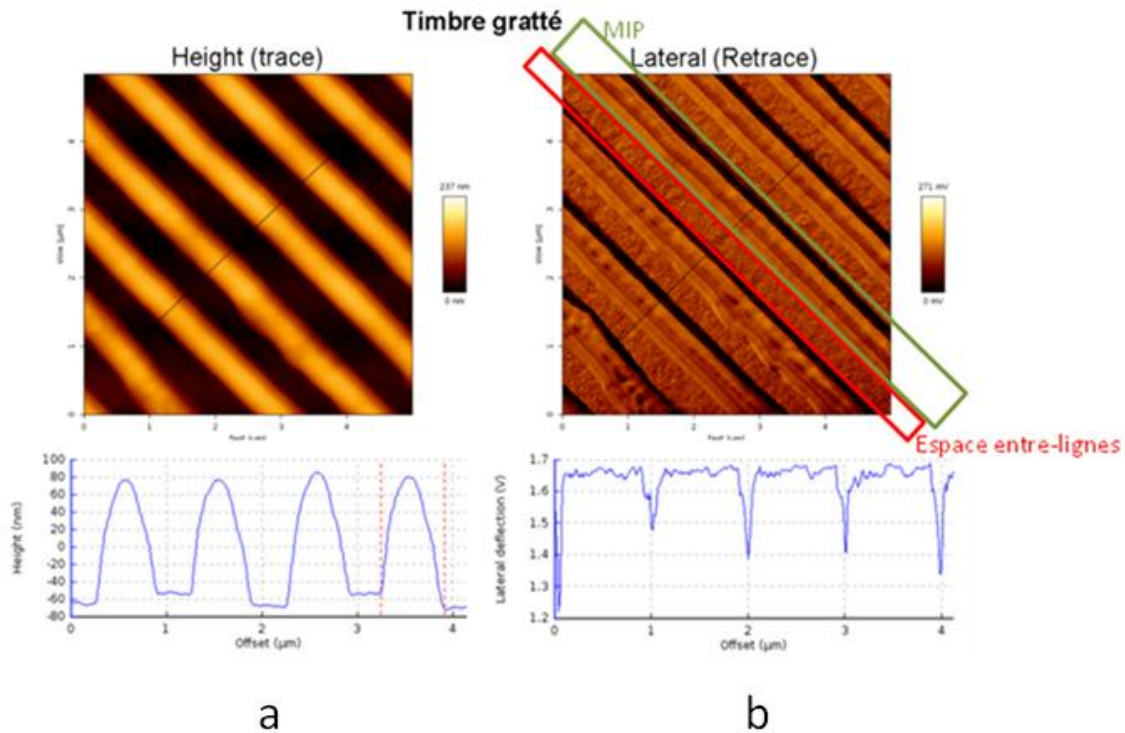


Figure 4.18 : Images AFM de a) topologie b) déflexion latérale d'une structuration de MIP réalisée à l'aide d'un timbre « b » en PDMS traité au plasma O_2 . Dans ce cas, le timbre a été « nettoyé » à l'aide d'un morceau de PDMS plat avant d'être déposé sur la surface.

L'analyse de la déflexion latérale d'une structuration réalisée avec un timbre « nettoyé » nous donne une nette différence entre les lignes et les creux. Sur l'image 4.18 **b**, on peut distinguer deux types de rugosités différentes : les lignes (rectangle vert « MIP ») et les creux (rectangle rouge « Espace entre-lignes »). En regardant les profils, on s'aperçoit que les lignes ont une épaisseur proche de 120 nm et une largeur d'environ 650 nm contre 750 nm pour **b**.

Interprétation

Le même phénomène qu'avec les dendrimères (chapitre II) se produit ici lorsque le timbre est traité au plasma O_2 . En effet, lors de la structuration de MIP avec un timbre traité au plasma O_2 nous obtenons l'inverse des motifs protubérants du timbre (Fig. 4.14).

Les images AFM de la figure 4.15, nous montre une nette différence de chimie de surface entre une structuration réalisée à l'aide un timbre nettoyé et non nettoyé. En effet, lorsque le timbre est nettoyé, la hauteur des lignes est moins importante. Les 200 nm d'épaisseur des lignes dans le cas 4.15 **a**, peut être expliqué par une présence trop importante de MIP. Ceci est confirmé par l'épaisseur réduite lorsque que le timbre est nettoyé. Dans les deux cas de la figure 4.15, les deux timbres avaient des réseaux de lignes de 500 nm au pas de 1 μm (timbre « b »). Sur l'image 4.15 **a** (sans nettoyage), les lignes sont larges de presque 800 nm. Cette largeur, bien supérieure au motif, peut être expliquée ici aussi par la présence trop importante de MIP. Une explication schématique peut être observée sur la figure 4.19.

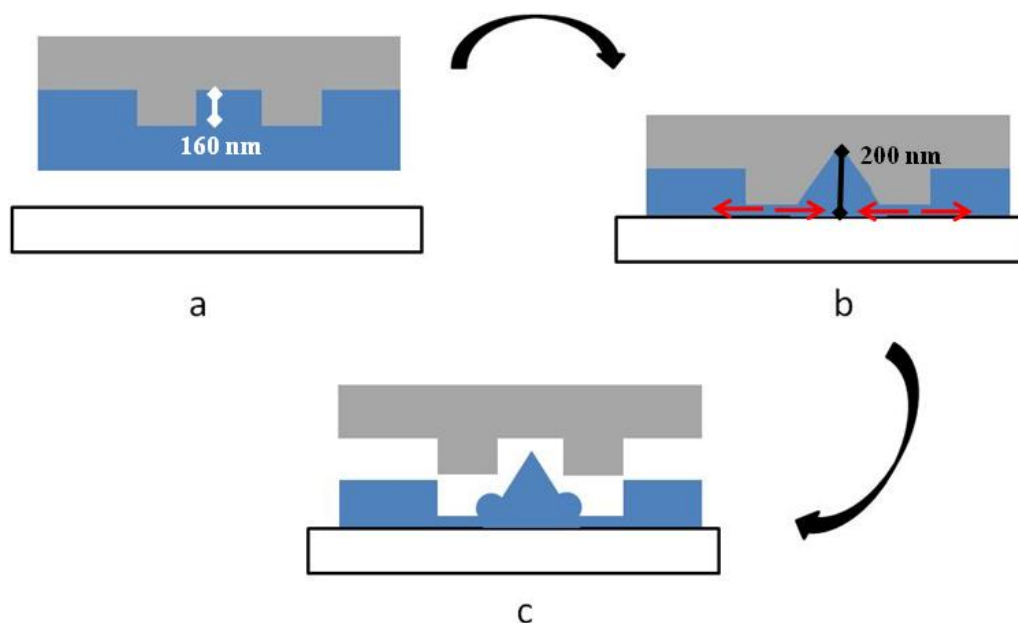


Figure 4.19 : *Représentation schématique d'une structuration de MIP lorsque le timbre en PDMS est traité au plasma O_2 et qu'il n'a pas été nettoyé.*

La figure 4.19 explique que le même phénomène qu'au chapitre II, lors de la structuration, se produit : la solution présente sur les protubérances du timbre est « poussée » sur les cotés extérieurs et intérieurs des protubérances. Cependant, la présence trop importante de MIP sur le timbre crée une accumulation dans les cavités, telle que le timbre se déforme (hauteur de lignes : 200 nm / profondeur des creux 160 nm) (Fig. 4.19 **b**). Cette déformation étant limitée, le surplus de MIP restant est chassé sur les cotés créant ainsi des lignes larges de 800 nm. De même, comme expliqué sur la figure 4.19, un film de MIP est déposé sur la toute la surface lors de la mise en contact du timbre et du substrat, ce qui explique la présence en

dehors d'un réseau d'une couche de MIP épaisse d'environ 200 nm. A contrario lorsque le timbre est nettoyé, il ne reste plus qu'une fine couche de MIP sur la surface de ce dernier (Fig. 4.20 a). Lors de la mise en contact du timbre sur le substrat, les MIP sur les protubérances sont chassés à l'intérieur des cavités, mais leur présence moins importante leur permet de rester dans la cavité sans la déformer (Fig. 4.20 b). Nous obtenons donc des lignes de 500 nm (largeur cavité) haute d'environ 120 nm. De même, lors du « nettoyage » du timbre, les MIP en surplus sur les bords des réseaux sont en grande partie enlevés, ce qui explique l'absence d'une couche épaisse de MIP en dehors des réseaux.

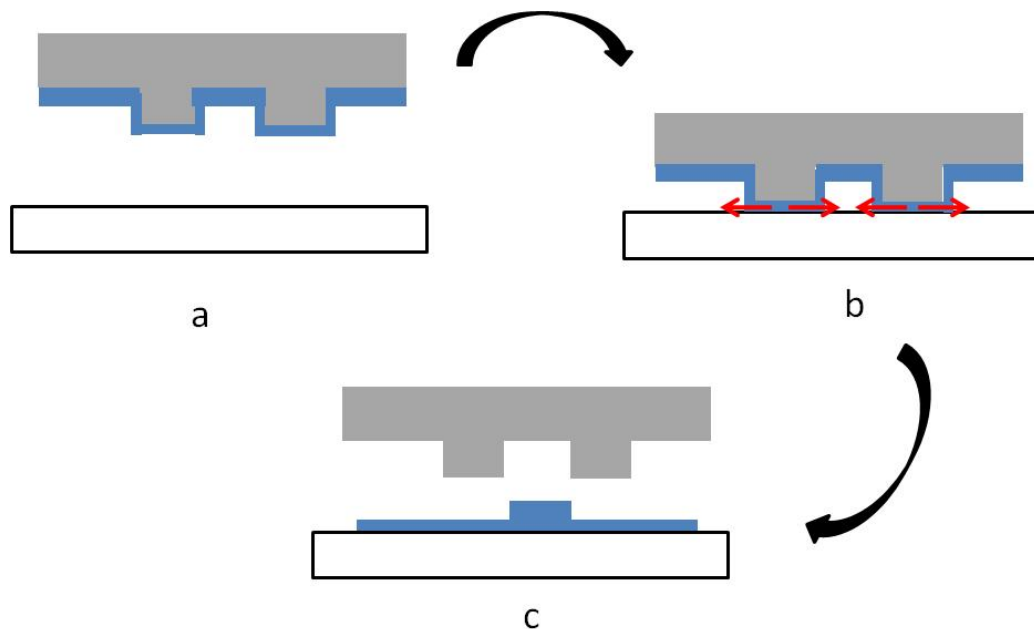


Figure 4.20 : Représentation schématique d'une structuration de MIP lorsque le timbre en PDMS est traité au plasma O_2 et qu'il a été nettoyé.

Nous pouvons donc conclure, que le fait de nettoyer le timbre incubé et séché avec un morceau de PDMS plat, permet donc clairement d'enlever le surplus de MIP. Le dépôt résultant est plus net, c'est-à-dire que les réseaux sont mieux définis et qu'il n'y a pas de couche épaisse continue sur l'ensemble du dépôt (même hors réseau).

L'analyse de la chimie de surface (déflexion latérale) est plus complexe, dans les deux cas. En effet, nous structurons la surface avec des MIP, nous ne les déposons pas selon les motifs. Cela veut dire qu'une couche de MIP est potentiellement déposée sur toute la surface, plus ou moins épaisse selon le traitement du timbre (nettoyé ou non). Une explication de la

structuration des MIP avec un timbre non nettoyé est représentée sur la figure 4.21. Cependant, au vu de l'analyse en déflexion, il est clair que nous avons des « amas » de MIP larges d'environ 200 nm espacés entre eux par de fines bandes d'environ 50 nm. Ces amas ont une rugosité différente des creux qui ont eux aussi une rugosité différente de la surface. Comme ces amas sont rassemblés par des lignes de 800 nm en analyse topologique, il ne peut pas s'agir d'un résidu de PDMS sur la surface (sinon l'analyse topologique donnerait des lignes de 200 nm espacées de 50 nm). Les points d'interrogation sur le schéma représentent des zones dont nous ignorons la nature.

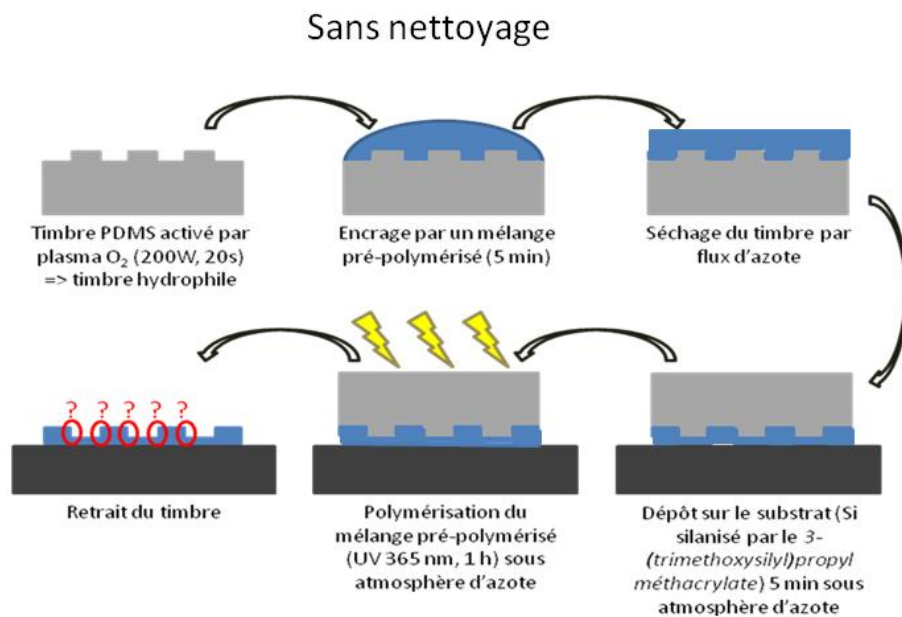


Figure 4.21 : Représentation du principe de structuration de MIP par lithographie douce avec un timbre traité au plasma O_2 non nettoyé.

L'analyse d'une structuration de MIP avec un timbre « nettoyé » est plus abordable car sur la figure 4.18 b nous pouvons observer seulement deux types différents de lignes, tout comme sur la figure 4.18 a. La largeur des lignes est légèrement plus importante dans le cas 4.18 b, mais ceci peut être dû à une accumulation sur les cotés intérieurs et extérieurs des protubérances. Cependant, la question de ce qui se trouve entre les lignes et sur les cotés des lignes (plus larges en déflexion qu'en topologie) reste présente (Fig. 4.22). De même, les points d'interrogations sont des zones (ou des étapes) à éclaircir.

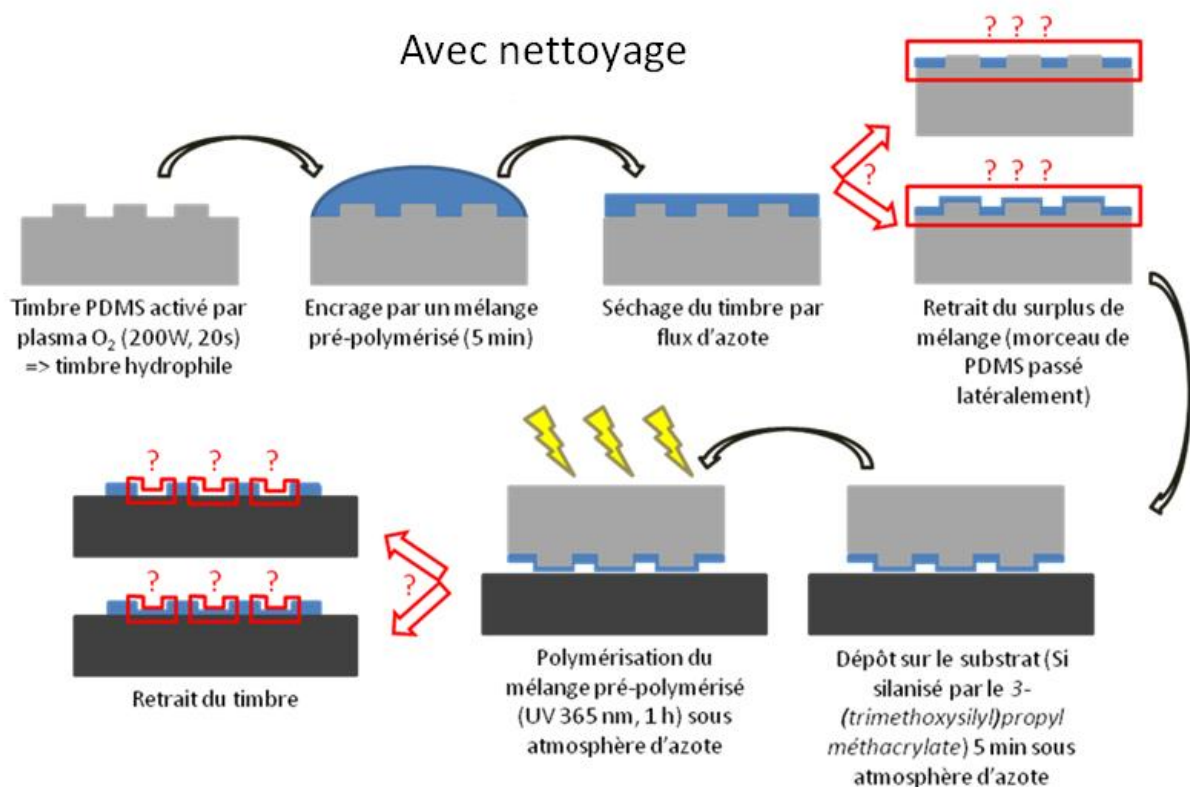


Figure 4.22 : Représentation du principe de structuration de MIP par lithographie douce avec un timbre traité au plasma O_2 nettoyé.

Conclusion :

La toute première conclusion est qu'il est possible de structurer des MIP par lithographie douce. Bien que la « technique » employée soit du μ CP, nous avons pu voir que la structuration avait lieu différemment. En effet, tout d'abord les dépôts ont lieu selon l'inverse des motifs protubérants du timbre. Deuxièmement une couche de MIP se trouve partout sur la surface.

La question peut se poser sur les variations de la déflexion qui ne suivent pas exactement la variation des lignes en topologie. En effet, les « trous » des deux analyses de déflexion (4.17 **b** et 4.18 **b**), ont une rugosité différente des MIP (lignes) mais aussi différente du substrat. Il est possible pour le cas du timbre « nettoyé » que les creux en topologie correspondent à des traces de PDMS sur la surface (rugosité très faible). En effet, nous avons vu qu'un timbre en PDMS traité adhère énormément à la surface, au risque de se coller dessus. Cependant, dans le cas d'un timbre non nettoyé, la déflexion ne concorde pas du tout

avec la topologie. Il n'est pas possible que les creux en déflexion correspondent à des MIP ou au substrat. La question est : à quoi correspondent-ils ? Des morceaux de PDMS arrachés au timbre ? Un mélange entre des MIP et du PDMS collé à la surface ? etc. La polymérisation sous UV des MIP agit-elle sur le PDMS en créant une réaction chimique entre le solvant, le PDMS traité et la surface ? Que se passe-t-il exactement au niveau des points d'interrogation sur les schémas 4.21 et 4.22 ? Il est clair qu'à ce stade une analyse plus approfondie est nécessaire. Une étude par AFM ainsi que par l'utilisation du module HarmoniX de l'AFM VEECO³² qui peut donner les modules d'élasticité de chaque partie du dépôt et ainsi obtenir une carte des propriétés d'adhésion, de raideur ou encore de dissipation des différentes zones de la surface est en cours à l'heure de rédaction.

A présent nous pouvons passer aux aspects applicatifs de la structuration de MIP par lithographie douce : la reconnaissance en fluorescence et la spécificité.

IV-2-3 : Aspect applicatif : reconnaissance spécifique de la molécule cible

Afin de pouvoir mettre en application les résultats obtenus par structuration de MIP par lithographie douce, nous avons voulu vérifier la capacité des MIP à reconnaître une molécule cible. Pour cela un MIP ayant comme empreinte une molécule de Z-l-phenylalanine a été étudié. Bien que la molécule initiale ne soit pas fluorescente, les divers cycles d'incubation ont été réalisés avec un dansyl-l-phenylalanine (nommé dansyl dans la suite), dérivé fluorescent de la molécule empreinte. Grâce à une redondance de cycles d'extraction et d'incubation, nous avons pu tester la capacité de reconnaissance d'une molécule ainsi que la spécificité de cette reconnaissance. Une explication du principe des cycles d'extraction et d'incubation est montrée sur la figure 4.23.

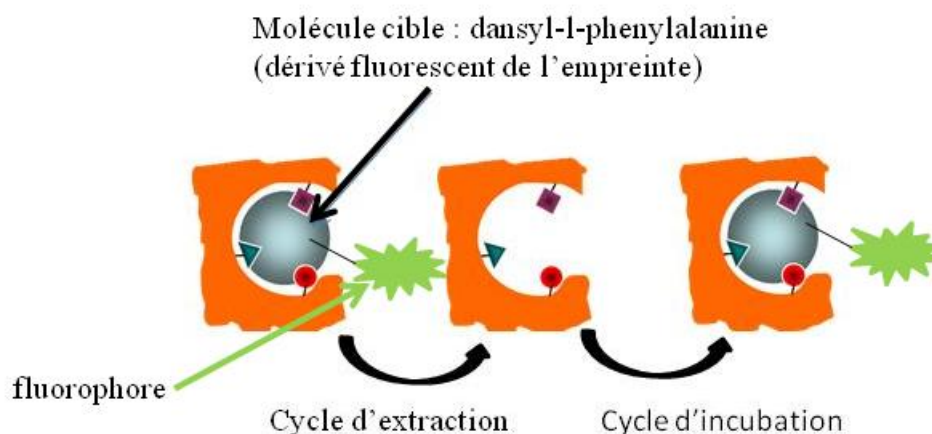


Figure 4.23 : Représentation d'un cycle d'extraction et d'un cycle d'incubation. Lorsque la molécule cible est présente dans l'empreinte du polymère, il y a fluorescence.

Des structurations de MIP Z-l-phenylalanine, ainsi que de son contrôle le NIP, ont été réalisées à l'aide de timbres en PDMS traités au plasma O_2 . Plusieurs cycles d'extraction et d'incubation ont été réalisés et les résultats peuvent être observés sur la figure 4.24. La première image en fluorescence (molécule extraite) ne correspond pas au premier cycle d'extraction du Z-l-phenylalanine, molécule empreinte non fluorescente. Elle correspond à un cycle d'extraction ayant eu lieu après plusieurs autres cycles. Comme dit précédemment, les cycles d'extraction et d'incubation sont répétables. La longueur d'onde d'excitation des molécules fluorescentes est à 360 nm, et leur collection à 420 nm.

Les premiers éléments à analyser sont les images en fluorescence des structurations de MIP et de NIP. Après extraction, le MIP émet une légère fluorescence, alors que le dansyl n'est pas présent. Cette légère fluorescence, qui est présente à tous les cycles d'extraction, correspond à la présence résiduelle d'analyte qui n'a pas pu être extrait. Lors des extractions la fluorescence du NIP est nulle, ce qui s'accorde avec le fait que le polymère ne contient pas les empreintes de la molécule. Après incubation pendant 12 heures dans une solution de dansyl-l-phénylalanine à 100 μM , la fluorescence du MIP est plus intense, et donc révélatrice de la liaison du dansyl. Il est aussi à noter que le NIP fluoresce aussi légèrement après les cycles d'incubation alors qu'il ne contient pas l'empreinte de la molécule à détecter. Ceci peut être dû à des interactions non spécifiques. Cependant, il faut voir ici que la fluorescence est prise d'un point de vue comparatif entre le MIP et le NIP. Il faut donc comprendre que, bien que le NIP fluoresce, son intensité de fluorescence est bien moins importante que dans le cas

du MIP. En regardant le graphique en dessous des images (Fig. 4.24 b), il est clair que l'intensité de fluorescence du NIP après incubation est non manifeste comparée à l'intensité du MIP. Il en est de même pour le deuxième cycle d'incubation : l'intensité de fluorescence du NIP est plus faible que celle du MIP.

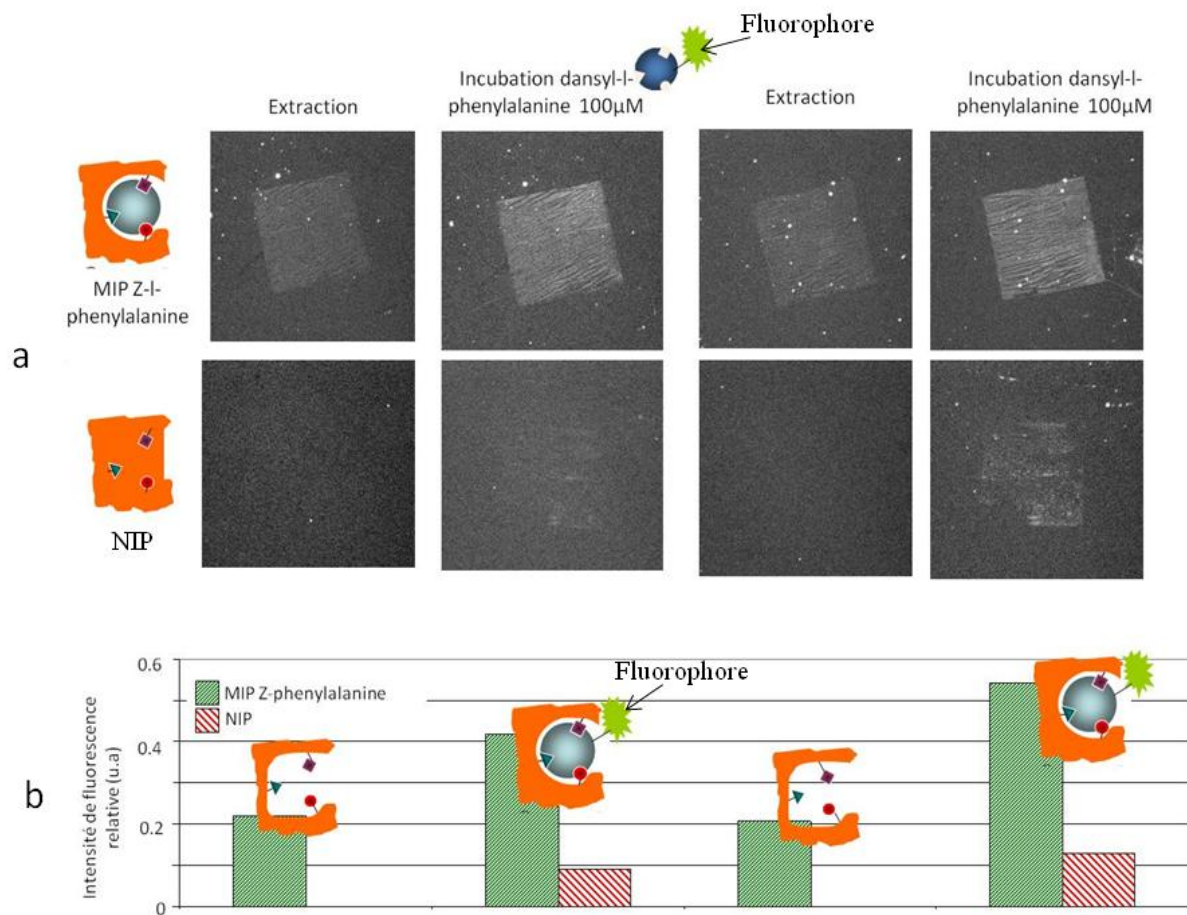


Figure 4.24 : Etude en fluorescence des cycles d'extraction et d'incubation du dansyl-L-phénylalanine (dérivé fluorescent du Z-l-phénylalanine) dans un MIP ayant les empreintes du Z-l-phénylalanine et dans un NIP n'ayant pas les empreintes du polymère.

a) Haut : Image en fluorescence des structurations de MIP réalisées par lithographie douce.

Bas : Image en fluorescence des structurations de NIP réalisées par lithographie douce.

b) Etude statistique de l'intensité de fluorescence selon les cycles.

Ces premiers résultats, très encourageants, donnent une réponse significative de la reconnaissance de la molécule cible ainsi que de la spécificité de cette reconnaissance. L'intensité de la fluorescence du MIP après incubation est nettement plus importante qu'après extraction et plus élevée que l'intensité de NIP après incubation. Nous pouvons donc conclure à de nombreuses interactions spécifiques entre le MIP et le dansyl. Bien que seuls deux cycles d'extraction et d'incubation aient été montrés sur les images en fluorescence, de nombreux autres cycles ont été réalisés en obtenant une réponse comparable. Cette analyse quantitative, présentée sur le graphique de la figure 4.24, semble confirmer la reconnaissance spécifique de l'analyte par un MIP structuré par lithographie douce pour différents cycles.

Ces résultats ne doivent pas être pris pour acquis. Nous sommes en effet bien loin du transfert industriel de cette technique de structuration pour ce type de molécule dans le cadre d'une détection d'interaction par diffraction. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent de nombreux autres tests afin de s'assurer de la spécificité des réactions et de la reproductibilité de ces expériences. Par exemple, l'autre énantiomère de l'analyte, le dansyl-D-phénylalanine, pourrait être incubé sur les polymères et ainsi tester la spécificité de la reconnaissance par une molécule structurellement proche. De plus, il serait nécessaire de poursuivre des tests afin de mettre en évidence l'avantage de réaliser une structuration de MIP à l'échelle nanométrique. On pourrait citer par exemple la comparaison des différentes intensités de fluorescence, dans le cas d'une structuration de MIP en réseau de lignes par lithographie douce (les réseaux de lignes formant des carrés de $400 \times 400 \mu\text{m}$) et dans le cas d'une structuration de MIP par photolithographie (carré simple), à taille de dépôt égale. Une étude sur la capacité à détecter les interactions de molécules spécifiques et non spécifiques avec des MIP par diffraction serait aussi utile.

Au final, bien que ces travaux sur les MIP nécessitent des recherches plus longues et plus approfondies, ces premiers résultats sont extrêmement encourageants pour la suite des potentielles applications envisagées.

IV-3 : Conclusion

Les deux possibles améliorations présentées durant ce chapitre ne sont pas, à l'heure actuelle, transférables vers un partenaire industriel. En effet, de plus amples études et expériences seraient nécessaires à la mise en place d'un protocole à des fins industrielles. Cependant elles permettent d'envisager plusieurs solutions pour augmenter encore la versatilité de notre technologie, et ainsi en faire un détecteur générique n'ayant pas de barrière pour les molécules à détecter.

En envisageant une étude complète sur ces deux améliorations, la biopuce pourrait devenir un détecteur bas-coût et polyvalent : applicable à de nombreuses molécules grâce à la technologie MIP, coût de fabrication faible grâce à la lithographie douce à l'échelle nanométrique sans lithographie électronique et enfin détection sans marquage grâce à la diffraction.

Références

- 1: M. Pretzl, A. Schweikart, C. Hanske, A. Chiche *Langmuir* **2008**, 24, 12748.
- 2: M. A. Grinfeld, *Soviet. Phys. Dokl.* **1986**, 31, 831.
- 3: J. M. Gérard, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, 61, 2096.
- 4: N. Bowden, S. Brittain, A. Evans, J. Hutchinson, G. M. Whitesides *Nature* **1998**, 393, 146.
- 5: N. Bowden, W. T. S. Huck, K. E. Paul, G. M. Whiteside *Appl. Phys. Lett.* **1999**, 75, 2557.
- 6: A. Tserepi, E. Gogolides, K. Tsougeni, V. Constantoudis, E. S. Valamontes *J. Appl. Phys.* **2005**, 98, 113502.
- 7: W. T. S. Huck, N. Bowden, P. Onck, T. Pardoën, J. Hutchinson, G. M. Whitesides *Langmuir* **2000**, 16, 3497.
- 8: S. M. Gubanski, A. E. Vlastós *IEEE Trans Power Deliv* **1990**, 5, 1527.
- 9: S. H. Kim, E. A. Cherney, R. Hackam *IEEE Trans Electr Insul* **1992**, 5, 1065.
- 10: A. Tóth, I. Bertóti, M. Blazsó, G. Bánhegyi, A. Bogнар, X. Szaplanczay *J Appl Polym Sci* **1994**, 52, 1293.
- 11: H. Hillborg, J. F. Ankner, U. W. Gedde, G. D. Smith, H. K. Yasuda *Polymer* **2000**, 41, 6851-6863.
- 12 : D.B.H Chua, H.T Ng, S.F.Y. Li *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 76, 721.
- 13: K. Tsougeni, A. Tserepi, G. Boulousis, V. Constantoudis, E. Gogolides *Plasma Process. Polym.* **2007**, 4, 398.
- 14: M. Pretzl, A. Schweikart, C. Hanske, A. Chiche *Langmuir* **2008**, 24, 12749
- 15: K. Tsougeni, A. Tserepi, G. Boulousis, V. Constantoudis, E. Gogolides *J. Appl. Phys.* **2007**, 46, 744.
- 16 : D. A. Tomalia, H. Baker *Macromolecules* **1986**, 19, 2466
- 17 : C. Larré, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 595-599
- 18 : Y. Ribourdouille 2004. *Thèse d'université*, Université louis pasteur, laboratoire de chimie organométallique et de catalyse (umr 7513)

- 19 : G. Boiteux, P. Dublineau, M. Feve, C. Mathieu, G. Seytre, G. Ulanski, *J. Polym Bull* **1993**, 30, 441.
- 20: A. Bietsch, B. Michel *J. Appl. Phys. Lett.* **2000**, 88, 4310.
- 21: C. Thibault, C. Severac, E. Trévisiol and C. Vieu, *J. M.N.E* **2006**, 01, 213
- 22: D. C. Duffy, C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4974.
- 23: M. K. Chaudhury, G. M. Whitesides *Langmuir* **1991**, 7, 1013.
- 24: D. Kriz, K. Mosbach *Anal. Chim. Acta* **1995**, 300, 71.
- 25: K. Haupt, K. Noworyta, W. Kutner, *Anal. Commun.*, **1999**, 36, 391.
- 26 : F. Vandevelde, T. Leichle, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, K. Haupt *Langmuir* **2007**, 23, 6490.
- 27: M. Yan, A. Kapua *Anal. Chim. Acta* **2001**, 435, 163.
- 28: H. Shi, W-B. Tsai, M. D. Garrison, S. Ferrari, B. D. Ratner, *Nature* **1999**, 398, 593.
- 29 : L. M. Kindschy, E. C. Alocilja, *Trans. ASAE* **2004**, 47, 1375.
- 30: C. Ayela, F. Vandevelde, D. Lagrange, K. Haupt, L. Nicu *Ange. Chem. Int. Ed.* **2007**, 48, 9431.
- 31: A. L. Hillberg, K. R. Brain, C. J. Allender, *Adv. Drug Deliv. Rev* **2005**, 57, 1875.
- 32: <http://veeco.com/>

Conclusion et perspectives

Le but de mon travail de doctorat a été de développer une plateforme biopuce complète à bas coût en vue d'une industrialisation. Nous avons donc étudié à travers cette thèse, la fabrication de cette plateforme : la structuration de la biopuce (immobilisation des molécules sondes, chimie de surface) et la détection des interactions entre molécules. Nous avons essayé de repenser les étapes clés d'une plateforme afin de développer, dans chaque cas, un système rapide et peu onéreux. Différentes chimies de surface ont été envisagées et étudiées afin que l'immobilisation des molécules sondes soit optimum. Nous avons retenu la lithographie douce pour la structuration des biopuces pour la simplicité, la rapidité et le bas coût des matériaux employés (PDMS). Afin de pouvoir avoir recours au multiplexage (essentiel pour le diagnostic), nous avons développé le macrotimbre. Ce timbre en PDMS a en effet la capacité de déposer jusqu'à 800 molécules différentes en une seule fois et avec un seul timbre. Les 800 plots en PDMS qui le composent peuvent être structurés comme un timbre en PDMS « classique », à l'échelle nano ou micro. Ceci permet d'avoir plusieurs motifs nanométriques sur le même plot, permettant donc une redondance des mesures. Après la structuration de la biopuce, nous avons étudié le système de détection. La diffraction a été retenue car elle ne nécessite aucun marquage, ce qui permet un gain en temps et surtout ne comporte pas le risque de dénaturer les fonctions de la molécule lors de l'accroche du marqueur, ce qui pourrait entraîner un résultat faussé. Des tests, en statique et en temps réel, ont été réalisés afin de valider la diffraction comme technique de détection. Il a en effet été possible de mesurer une interaction entre une protéine et son anticorps et entre deux brins d'ADN parfaitement complémentaires. De plus, le système de détection permet d'identifier le type d'interaction : spécifique ou non spécifique, en une seule mesure. Cet avantage permet de se passer d'une deuxième mesure, nécessaire dans le cas de la fluorescence, qui a pour but de vérifier la spécificité de l'interaction. Deux brevets ont été déposés sur ces travaux : un sur le macrotimbre et l'autre sur le système de détection par diffraction.

Dans l'objectif d'élargir le champ d'action de la biopuce, des techniques de dépôts alternatives ont été étudiées. Premièrement, nous avons vu la possibilité d'obtenir deux réseaux de lignes présentant des dimensions opposées, mais avec l'utilisation d'un seul et unique moule. Le PDMS a en effet la capacité de voir sa chimie de surface modifiée par action d'un traitement approprié. La possibilité de structurer spontanément un timbre en

PDMS à l'échelle nanométrique, par traitement plasma, a aussi été étudié. Nous avons vu qu'il était possible de transférer les motifs spontanément générer du timbre vers le substrat en employant une encre adéquate. Cette technique permettrait de se passer de l'étape longue et coûteuse de lithographie électronique. Enfin, dans le but d'élargir un peu plus le spectre d'action de la biopuce, d'autres types de molécules, plus génériques, ont été étudiées.

D'autres travaux et d'autres tests sont à réaliser avant d'envisager un transfert au milieu industriel. Cependant, les recherches ont avancé convenablement et les premiers résultats obtenus donnent l'espoir qu'un prototype pourra bientôt être développé. Les premières améliorations devraient logiquement être une automatisation du dépôt à l'aide du macrotimbre (en cours) et du placement de la biopuce sur le système de détection, permettant ainsi de limiter les erreurs de résultats dus aux manipulations humaines.

Outre le point de vue industriel, le bien-être du patient a aussi été pris en compte dans le développement de cette plateforme. En effet, plus elle sera performante, plus elle rendra rapidement des analyses précises. Moins d'angoisse d'attente des résultats, donc meilleur confort pour le patient, mais aussi la possibilité de commencer le traitement le mieux adapté le plus tôt possible. De même, au vu de la couverture sociale existante (ou non existante) dans de nombreux pays, et sa prochaine disparition dans d'autres, il est nécessaire de trouver d'autres méthodes de diagnostic et de soins moins onéreuses que celles qui existent actuellement. L'utilisation d'analyses par biopuce dans les hôpitaux et dans les laboratoires d'analyses doit se démocratiser afin que chacun puisse prétendre à de meilleurs diagnostics et à de meilleurs traitements.

Au final, au-delà de l'intérêt industriel de réaliser des produits moins chers et plus performants, cette thèse a aussi eu pour but de généraliser les techniques des organismes de recherches au domaine public. Car n'est-ce pas le but ultime des avancées scientifiques ? Simplifier la vie de l'Homme, la rendre plus agréable, plus plaisante, plus facile ? Le transfert entre recherche académique et industrialisation est parfois difficile, voir impossible selon le type de recherche. Un des problèmes majeurs qui se pose dans le développement de n'importe quelle technologie est le détournement de sa réelle utilité. Combien de nobles découvertes ont-elles été détournées à des fins pécuniaires, personnelles ou malveillantes ? Les nanotechnologies sont plus que jamais à surveiller. Leur utilisation peut être aussi bénéfique que néfaste. Plus que jamais les scientifiques doivent travailler main dans la main avec des

philosophes car les chercheurs ne peuvent plus à l'heure actuelle se contenter de science pure mais doivent prendre en compte les résultats des recherches en sciences sociales et leur apport dans le domaine de l'éthique. De même, un travail en collaboration avec des journalistes doit être fait dans le but de communiquer avec la population, car une personne éclairée ne craint pas le changement.

