INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

Département de Chimie Physique des Réactions, UMR 7630 CNRS-INPL

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Discipline : Génie des Procédés

Ecole Doctorale Science et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Fanny EVENOU

le 23 octobre 2006

Irradiations localisées pour des greffages covalents sur supports

JURY

Rapporteurs	Valery G. BABAK
	Philippe GEOFFROY
Examinateurs	Nadine MARTINET
	André MERLIN
	Marie-Christiane CARRE
	Serge CORBEL
Invités	Mireille DONNER
	Francis BAROS

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) de Nancy, au sein du Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR), UMR 7630 CNRS-INPL.

Je tiens tout d'abord à remercier les Directeurs du DCPR pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire : Madame Marie-Laure Viriot, DR CNRS tout d'abord, ainsi que Monsieur Gabriel Wild, DR CNRS qui lui a succédé dans ses fonctions.

Je remercie ensuite chaleureusement Madame Marie-Christiane Carré, CR INSERM, Messieurs Serge Corbel et Francis Baros, CR CNRS pour m'avoir encadrée au cours de ces trois années et m'avoir fait partager leurs connaissances et compétences aussi bien sur le plan théorique qu'expérimental.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Messieurs Valery Babak, Professeur à l'Académie des Sciences de Moscou, Philippe Geoffroy, CR CNRS à l'Université de Strasbourg et André Merlin, Professeur à l'Université Henri Poincaré de Nancy, pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame Nadine Martinet, DR INSERM pour son implication dans mon sujet de recherche, sa motivation et pour l'aide qu'elle m'a apportée pour que je puisse mener à bien mes travaux.

Je remercie Madame Mireille Donner, DR INSERM pour l'intérêt qu'elle a manifesté vis-à-vis de ce travail ainsi que pour sa disponibilité et son aide.

Je remercie Hervé Le Gall pour son aide et sa compétence.

Je remercie aussi tout particulièrement Christian Receveur pour sa gentillesse, son aide précieuse, sa disponibilité et ses explications passionnées.

Je remercie à leur tour pour leur gentillesse, leur humanité ou encore l'aide qu'il ont bien voulu et su m'apporter : Nathalie Petijean, Denise Hagnier, Alain Paternotte, Pierre Pommier, Lucie Coniglio-Jaubert, Céline Frochot et Orfan Zahraa.

Je tiens à remercier (dans l'ordre de présentation dans le bureau du point de vue de ma chaise) : Guillaume, mon nouveau collègue d'en face, pour sa sympathie, pour sa connaissance de la langue anglaise digne d'un dictionnaire Harraps, pour m'avoir récupéré ma table de cuisine, et à qui je souhaite bonne chance pour la suite ; Momo ou Mohhhhhhhhhhhamed pour sa sympathie, pour les pauses passées ensemble, et pour son adhésion à mon humour ; Freufreu, pour la complicité qu'il y a pu avoir entre nous à la grande époque, pour son humour et les pauses, pour les thésards, pour l'enquête à propos du … du matin, pour les repas-thésards, pour up'cming'split (que je n'oublierai pas de prendre dans mes bagages !), et pour le Lux' ; Tylvain Suchard, pour sa grande connaissance de la langue latine, ses 'blagues', sa modestie, ses chemises roses ; Emir, pour le souvenir de mon appart à Nancy ; le mec (qui risque déjà d'être vexé d'être à cette position dans mes remerciements, mais j'ai déjà expliqué pourquoi !), pour sa gentillesse et sa grande générosité sans nulle autre pareille, sa maturité, ses citations/métaphores/anecdotes éclairées, pour m'avoir appris l'arabe (un petit peu), pour sa bonne humeur, pour les bourraks et je m'arrête là avant que les chevilles gonflent trop malgré sa très grande modestie ; Matthieu, que je regrette de ne pas avoir davantage connu ; Nono pour son sourire ; Hichem, pour sa gentillesse ; Jean-Phi, pour sa sympathie et pour avoir égayé le labo de chimie cette dernière année ; Christophe, pour le post-doc et sa disponibilité au grand jeu 'question pour un champion'.

Mes remerciements les plus sincères à mes zamis qui m'ont rendu la vie à Nancy particulièrement agréable et pour longtemps j'espère encore : Fred-Bidouille, Gaby, Antoine, Alex, Jalil, Beber, Smurss.

Je remercie enfin, mais non pas le moins, Zouzou, qui va énormément me manquer, pour le soleil qu'il a fait entrer dans ma vie, pour son amour constant et sans faille, et quoiqu'en disent les mauvaises langues, parfaitement désintéressé.

SOMMAIRE GÉNÉRAL

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

A.I. Les biopuces 9
A.II. Stratégies d'immobilisation des sondes sur différents types de supports 19
A.III. Localisation des greffages sur les supports 32
A.IV. Détection des interactions sonde/cible 37
A.V. Objectifs et organisation de la thèse 43

B. GREFFAGES COVALENTS SUR SUPPORTS PLANS 45

B.I. Choix du support 49
B.II. Les techniques et systèmes d'analyse utilisés 52
B.III. Caractérisation des supports commerciaux 55
B.IV. Greffage covalent de traceurs fluorescents sur les lames commerciales 67
B.V. Partie expérimentale 73
B.VI. Conclusion sur les greffages sur supports 79

C. LOCALISATION DES SITES RÉACTIONNELS 81

C.I. Mise en oeuvre de la stéréolithographie 85
C.II. Méthode de localisation des sites 92
C.III. La résine de photopolymérisation : la SU-8 5 95
C.IV. Fabrication des motifs en polymère 99
C.V. Analyse par profilométrie optique 108
C.VI. Résultats des analyses réalisées avec le profilomètre optique 110
C.VII. Stabilité du polymère dans différents solvants 132

D. LOCALISATION DES GREFFAGES COVALENTS 135

D.I. Localisation des greffages 139
D.II. Puits en polymère 150
D.III. Plots en polymère 165
D.IV. Conclusion 171

E. PRÉPARATION DES SUPPORTS EN VUE DU GREFFAGE ORIENTÉ D'ANTICORPS 173

E.I. Préparation des supports fonctionnalisés 177
E.II. Greffage du bras espaceur diamino sur les lames S 181
E.III. Fonctionnalisation du bras espaceur 188
E.IV. Partie expérimentale 195
E.V. Conclusion 203

TABLE DES MATIÈRES

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

A.I. Les biopuces 9

A.I.1. Les puces à ADN 10

A.I.1.1. Rappels sur l'ADN 10

A.I.1.2. Principe des puces à ADN 11

A.I.2. Les puces à protéines et à anticorps 12

A.I.2.1. Les protéines 12

A.I.2.2. Les anticorps 14

A.I.3. Les puces à peptides 17

A.I.4. Les puces à carbohydrates 17

A.II. Stratégies d'immobilisation des sondes sur différents types de supports 19

A.II.1. Les matériaux les plus utilisés 19

A.II.2. Immobilisation des sondes oligonucléotidiques 20

A.II.3. Fixation des protéines sur les supports 21

A.II.3.1. La diffusion dans un gel 22

A.II.3.2. L'adsorption 22

A.II.3.3. La fixation par affinité 23

A.II.3.4. La fixation par une liaison covalente 24

A.II.4. Greffage orienté des anticorps sur les supports 27

A.II.4.1. Greffage orienté des anticorps par les sulfhydryles 27

A.II.4.2. Greffage orienté d'anticorps par les carbohydrates du fragment Fc 28

A.II.4.3. Fixation orientée par affinité 29

A.II.5. Immobilisation des peptides sur les supports 30

A.II.6. Immobilisation des carbohydrates sur les supports 31

A.III. Localisation des greffages sur les supports 32

A.III.1. Localisation par des techniques photochimiques 32

A.III.1.1. Utilisation de groupes photolabiles 32

A.III.1.2. Utilisation d'une résine photosensible 34

A.III.2. Fabrication de micropuits et de microcanaux en PDMS 34

A.III.3. Localisation par des techniques de microcontact 35

A.III.4. Localisation par des techniques basées sur l'éjection de molécules 36

A.IV. Détection des interactions sonde/cible 37

A.IV.1. Méthodes d'analyse directe 37

A.IV.1.1. Microbalance piézoélectrique (QCM) 37

A.IV.1.2. La microscopie à force atomique (AFM) 38

A.IV.1.3. Méthodes optiques utilisant les ondes évanescentes 38

A.IV.2. Méthodes d'analyse indirecte 39

A.IV.2.1. Les techniques fluorimétriques 39

A.IV.2.2. La chimiluminescence 41

A.IV.2.3. La détection chromogénique 41

A.IV.2.4. Utilisation de marqueurs radioactifs 41

A.IV.2.5. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) 41

A.IV.3. Récapitulatif des différentes techniques d'analyse les plus utilisées 42

A.V. Objectifs et organisation de la thèse 43

B. GREFFAGES COVALENTS SUR SUPPORTS PLANS 45

B.I. Choix du support 49
B.I.1. Choix du support : les lames de verre silanisées 49
B.I.1.1. Silanisation du support 49
B.I.1.2. Les supports commerciaux 50
B.II. Les techniques et systèmes d'analyse utilisés 52
B.II.1. La spectroscopie d'absorption UV-visible 52
B.II.2. La spectroscopie de fluorescence 53
B.III. Caractérisation des supports commerciaux 55
B.III.1. Description des lames S 55
B.III.2. Caractéristiques spectroscopiques 56
B.III.3. Dosage des groupements amino surfaciques 57
B.III.3.1. Méthode de dosage par le *p*-nitrobenzaldéhyde 57
B.III.3.2. Méthode de dosage par la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine 58
B.IV. Greffage covalent de traceurs fluorescents sur les lames commerciales 67
B.IV.1. Cas du rotor fluorescent acide CiCOOH 67
B.IV.1.1. Activation de la fonction acide du traceur CiCOOH par le NHS 68
B.IV.1.2. Greffage du composé CiNHS sur les lames S 68
B.IV.1.3. Analyse du greffage 68
Cas du dérivé coumarine CouCOOH 70
B.IV.2.1. Greffage du composé CouCOOH sur les lames S 70
B.IV.2.2. Analyse du greffage 71
B.V. Partie expérimentale 73
B.V.1. Matériels et méthodes 73
B.V.2. Dosage des fonctions amine des supports par le p-nitrobenzaldéhyde 75
B.V.2.1. Formation des imines 75
B.V.2.2. Hydrolyse acide des imines 75
B.V.3. Dosage des fonctions amine des supports par CouCHO 75
B.V.3.1. Formation des imines 75
B.V.3.2. Hydrolyse acide des imines 75
B.V.4. Greffage du traceur fluorescent cinnamilydène sur les lames S 76
B.V.4.1. Activation sous forme d'ester de succinimidyle du composé CiCOOH 76
B.V.4.2. Greffage du composé CiNHS sur les lames S 76
B.V.5. Greffage du dérivé coumarine acide CouCOOH sur les lames S 77
B.V.5.1. Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique 77
B.V.5.2. Activation sous forme d'ester de succinimidyle du composé CouCOOH 77
B.V.5.3. Greffage du composé CouNHS sur les lames S 78
B.VI. Conclusion sur les greffages sur supports 79

C. LOCALISATION DES SITES RÉACTIONNELS 81

C.I. Mise en oeuvre de la stéréolithographie 85
C.I.1. Description du procédé 85
C.I.2. Méthode d'irradiation 88
C.I.2.1. Répartition de l'énergie du faisceau laser 88
C.I.2.2. Autres éléments optiques du montage et réglages 90
C.II. Méthode de localisation des sites 92
C.II.1. Puits en polymère 92
C.II.1.1. Matrice de puits réactionnels 92
C.II.1.2. Avantages et inconvénients de la méthode 93
C.II.2. Plots en polymère 93
C.II.2.1. Matrice de plots en polymère 93
C.II.2.2. Avantages et inconvénients de la méthode 94
C.III. La résine de photopolymérisation : la SU-8 5 95
C.III.1. Choix de la résine 95
C.III.2. Caractéristiques de la SU-8 95
C.III.2.1. Composition et données physico-chimiques 96
C.III.2.2. Mécanisme de la polymérisation 97
C.IV. Fabrication des motifs en polymère 99
C.IV.1. Protocole de pré-polymérisation 99
C.IV.1.1. Dépôt et étalement de la résine sur le support 99
C.IV.1.2. Précuit 101
C.IV.2. Protocole de photopolymérisation 101
C.IV.2.1. Description du balayage laser d'un motif 101
C.IV.2.2. Programme de pilotage de l'automate 102
C.IV.2.3. Protocole de photopolymérisation 103
C.IV.3. Protocole de post-polymérisation 105
C.IV.3.1. Premier recuit de durcissement 105
C.IV.3.2. Révélation 106
C.IV.3.3. Irradiation post-polymérisation 106
C.IV.3.4. Deuxième recuit de durcissement 106
C.IV.4. Protocole global 107
C.V. Analyse par profilométrie optique 108
C.V.1. Principe de la profilométrie optique 108
C.V.2. Analyse au profilomètre optique 109
C.VI. Résultats des analyses réalisées avec le profilomètre optique 110
C.VI.1. Puits en polymère 110
C.VI.1.1. Photofabrication de puits de grandes dimensions 110
C.VI.1.2. Photofabrication de puits de diamètres variables 115
C.VI.1.3. Matrices de puits de diamètres constants 119
C.VI.1.4. Précision de la photopolymérisation 123
C.VI.2. Plots en polymère 126
C.VI.2.1. Photofabrication de deux plots 126
C.VI.2.2. Photofabrication de plots de diamètres variables 128
C.VI.3. Conclusion concernant la photofabrication 131
C.VII. Stabilité du polymère dans différents solvants 132

D. LOCALISATION DES GREFFAGES COVALENTS 135

D.I. Localisation des greffages 139
D.I.1. Principe des deux méthodes de localisation des greffages 139
D.I.1.1. Localisation des greffages à l'intérieur de puits en polymère 139
D.I.1.2. Localisation des greffages à la place de plots en polymère 140
D.I.2. Détection des greffages localisés – Utilisation de la microscopie à fluorescence 141
D.I.3. Etanchéité du polymère 144
D.I.3.1. Greffage par mouillage de CiNHS sur des plaques polymérisées 144
D.I.3.2. Greffage par mouillage de CouNHS sur des plaques polymérisées 145
D.II. Puits en polymère 150
D.II.1. Greffage localisé sur une lame d'un seul fluorophore 150
D.II.1.1. Greffage localisé de CouNHS à l'intérieur des puits 150
D.II.1.2. Greffage localisé de CiNHS à l'intérieur des puits 155
D.II.2. Greffage localisé de deux fluorophores différents sur une même lame 157
D.II.2.1. Greffage localisé de CiNHS et de CouNHS à l'intérieur de 2 puits distincts 157
D.II.2.2. Greffage localisé de CiNHS et de CouNHS à l'intérieur d'une matrice de puits 159
D.II.3. Greffages localisés réalisés au cours du temps 162
D.II.3.1. Greffages de CiNHS et de CouNHS réalisés au cours du temps 162
D.II.3.2. Greffage optimisé de CiNHS à l'intérieur d'un puits 164
D.III. Plots en polymère 165
D.III.1. Etude de la réactivité des sites $-NH_2$ protégés par le polymère 165
D.III.2. Protection chimique des fonctions amine 167
D.III.2.1. Activation de l'acide dodécanoïque par le NHS et greffage sur les supports 167
D.III.2.2. Validation du "capping" chimique 167
D.IV. Conclusion 171

E. PRÉPARATION DES SUPPORTS EN VUE DU GREFFAGE ORIENTÉ D'ANTICORPS..... 173

E.I. Préparation des supports fonctionnalisés..... 177
E.I.1. Synthèse du bras espaceur terminé par les fonctions aminooxy ou hydrazide..... 178
E.I.2. Validation des différentes étapes entrant dans la synthèse du bras espaceur..... 179
E.II. Greffage du bras espaceur diamino sur les lames S 181
E.II.1. Introduction sur les supports d'une fonction acide activée sous forme d'ester de succinimidyle 181
E.II.1.1. Action de l'anhydride succinique sur les lames silanisées $–NH_2$..... 181
E.II.1.2. Activation de la fonction acide sous forme d'ester de succinimidyle..... 182
E.II.1.3. Caractérisation des supports activés par une fonction ester de succinimidyle 182
E.II.2. Greffage du composé NH_2-POE-NH_2 sur les supports activés –COONHS 185
E.III. Fonctionnalisation du bras espaceur 188
E.III.1. Introduction de la fonction aminooxy..... 188
E.III.2. Introduction de la fonction hydrazide..... 190
E.III.2.1. Introduction sur le bras espaceur d'une fonction acide carboxylique activée sous forme d'ester de succinimidyle 191
E.III.2.2. Introduction et caractérisation de la fonction hydrazide en bout de bras espaceur..... 192
E.IV. Partie expérimentale..... 195
E.IV.1. Matériels et méthodes..... 195
E.IV.2. Description des différentes étapes entrant dans la synthèse du bras espaceur .. 196
E.IV.2.1. Greffage de l'anhydride succinique sur les supports $–NH_2$ et –NH-POE-NH_2 196
E.IV.2.2. Activation de la fonction acide carboxylique par le NHS..... 196
E.IV.2.3. Greffage du bras espaceur diamino sur les plaques –COONHS 196
E.IV.2.4. Greffage du composé BE-Pht sur les supports -NH-POE-NH_2 et déblocage du groupement Pht 196
E.IV.2.5. Greffage du *tert*-butyl carbazate sur les supports –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2$COONHS et déblocage du groupement Boc 198
E.IV.3. Greffage des traceurs fluorescents CouCHO et $CouCONHNH_2$ sur les supports fonctionnalisés..... 199
E.IV.3.1. Greffage du composé CouCHO sur les supports aminés..... 199
E.IV.3.2. Greffage du composé $CouCONHNH_2$ sur les supports de type -COONHS 199
E.V. Conclusion..... 203

Liste des abréviations

A	Absorbance
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOtBu	Acétate de *tert*-butyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
APTS	Aminopropyltriéthoysilane
ARNm	Acide ribonucléique messager
Boc	Butoxycarbonyle
Boc-$NHNH_2$	*tert*-Butyl carbazate
BE-Pht	N-(2-Bromoéthoxy)phtalimide
CAO	Conception assistée par ordinateur
CCD	"Charge-coupled-device" (caméra)
CCM	Chromatographie sur couche mince
CiCOOH	Acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque
CiNHS	Ester de succinimidyle de l'acide CiCOOH
CouCHO	7-(N,N-Diéthylamino)-3-formylcoumarine
$CouCONHNH_2$	7-(N,N-Diéthylamino)coumarine-3-carboxyhydrazine
CouCOOH	Acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique
CouNHS	Ester de succinimidyle de l'acide CouCOOH
cps	Coups par seconde (corrigés par rapport au signal de référence)
DMF	Diméthylformamide
EDAC.HCl	Chlorhydrate de 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
Fl^*-COONHS	Traceurs fluorescents acides activés par le NHS (CiNHS et CouNHS)
HOBt	N-Hydroxybenzotriazole
Ig	Immunoglobuline
Lame S	Lame Silane-Prep Slides (Sigma)
NH_2-POE-NH_2	4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine

NHS	N-Hydroxysuccinimide
ODN	Oligodésoxyribonucléotide ou oligonucléotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PF	Point de fusion
PGMEA	Acétate de l'éther monométhylique du propylène glycol
Pht	Phtalimide
PLL	Poly-L-lysine
PM	Photomultiplicateur
RMN	Résonance magnétique nucléaire (spectroscopie)
SL	Stéréolithographie
SPR	Résonance des plasmons de surface
TEA	Triéthylamine
TFA	Acide trifluoroacétique
u.a.	Unité arbitraire

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La technologie des biopuces est relativement récente puisqu'elle date du début des années 1990 avec l'apparition des puces à ADN. Les biopuces constituent aujourd'hui un outil d'analyse très puissant pour l'étude d'interactions moléculaires avec une capacité de haut débit. Leur principe repose sur l'immobilisation de molécules sondes sur un support solide qui vont interagir spécifiquement avec des molécules cibles présentes dans le milieu d'analyse. La fixation des sondes en des endroits bien localisés sur le support permet la miniaturisation et le multiplexage du système, conférant au capteur la capacité de suivre différentes interactions de type sonde/cible au cours d'un même test. Cette technologie permet de réduire à la fois les quantités de réactifs requis pour leur mise en œuvre, ainsi que d'analytes. Il s'agit d'outils d'analyse hautement spécifiques, très sensibles, qui présentent une grande capacité de criblage, et qui peuvent être produits à grande échelle, et ce à moindre coût.

Il existe différents types de biopuces tels que les puces à ADN, à protéines, à anticorps, à cellules, etc., qui trouvent de nombreuses applications dans des domaines tels que la biologie moléculaire, la médecine, la pharmacie, l'agriculture, l'environnement …
Les puces à ADN correspondent aujourd'hui au type de biopuces le plus largement utilisé. Les progrès réalisés visent au développement des puces à protéines qui renseignent mieux sur le fonctionnement d'un organisme. Cependant, l'élaboration de ce type de biocapteur pose des problèmes ; du fait de leur sensibilité à leur environnement, ces molécules complexes que sont les protéines peuvent être dénaturées et perdre leurs propriétés spécifiques.

L'élaboration d'un biocapteur requiert la maîtrise de différents savoir-faire depuis la fixation des sondes sur les supports jusqu'à l'analyse des interactions sonde/cible. En fonction du type de biocapteur que l'on souhaite réaliser, les points importants à définir et/ou à développer sont le choix du support, le mode de fixation des molécules sondes, la méthode de localisation des dépôts et le mode de détection de l'interaction sonde/cible qui doit permettre une analyse sensible, précise et reproductible.

Nos travaux de recherche ont pour objet la réalisation d'un support plan fonctionnalisé et structuré sur lequel pourrait être immobilisé un nombre limité de sondes telles que des anticorps, des protéines, des carbohydrates.

Dans la première partie, sont présentés les différents points concernant la mise en œuvre d'un biocapteur qui sont : le choix du support, le mode de fixation des sondes sur les supports, la méthode de localisation des dépôts et le mode de détection des interactions sonde/cible.
Les lames de verre constituent le type de support le plus couramment utilisé car le matériau présente des propriétés intéressantes et se prête facilement à des modifications chimiques. Nous avons choisi d'utiliser des lames de verre silanisées avec un amino-silane, c'est-à-dire présentant des groupements amino en surface, qui vont permettre la fonctionnalisation du support pour l'immobilisation orientée des biomolécules par une liaison covalente stable. Les possibilités de greffage covalent sur les supports retenus pour cette étude ont été étudiées à partir de traceurs fluorescents, ce qui nous a amené à choisir comme méthode d'analyse les techniques de spectrofluorimétrie et de microscopie à fluorescence. Les résultats de cette étude seront présentés dans une deuxième partie.
Nous avons ensuite mis au point une méthode de localisation des réactions basée sur le procédé de photofabrication par stéréolithographie. Le choix de la résine et le protocole de dépôt et de polymérisation d'une monocouche de résine époxy seront exposés dans la troisième partie.
Pour tester la localisation des greffages covalents sur les supports qui fera l'objet d'une quatrième partie, nous avons poursuivi l'étude avec les mêmes traceurs fluorescents.
Après avoir validé ces différentes étapes, nous nous sommes attachés à fonctionnaliser les supports, de telle sorte qu'ils présentent un recouvrement permettant la fixation par une liaison covalente stable de molécules biologiques possédant dans leur structure, une ou plusieurs fonctions aldéhyde. Le détail de cette préparation sera décrit dans la dernière partie.

Ce travail de thèse est mené en collaboration avec Mme N. Martinet, DR INSERM (INSERM U724/CRB, Nancy) et Mme M. Donner, DR INSERM (INSERM U724, Nancy) dans le cadre de travaux de recherche contre le cancer du poumon. L'application concerne plus précisément la mise en oeuvre d'un biocapteur à récepteurs des rétinoïdes, à partir des supports fonctionnels préparés au cours de notre étude.

1ère partie : Partie A

A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Dans le domaine de la biologie moléculaire, les techniques de génotypage dont le principe repose sur l'hybridation de séquences complémentaires de fragments d'ADN, ont permis l'identification des gènes, de connaître leur expression, de déceler les mutations… Ces techniques n'ont cessé d'évoluer vers la mise en œuvre d'outils de plus en plus puissants, rapides, simples d'utilisation et économiques ; c'est dans ce contexte que sont apparues au début des années 1990 les puces à ADN, qui constituent encore aujourd'hui un outil d'analyse parmi les plus largement utilisés. L'information génétique ne renseigne cependant pas complètement sur le fonctionnement d'un organisme (à l'échelle de la cellule, des protéines…) ; les taux d'ARNm ne correspondent pas toujours aux niveaux d'expression des protéines synthétisées, qui peuvent par ailleurs subir des modifications post-traductionnelles. Les progrès réalisés aujourd'hui visent surtout à élargir la technique des puces à ADN aux protéines, aux carbohydrates, aux cellules…

La technologie des biopuces trouve de nombreuses applications dans des secteurs aussi variés que la recherche (biologie moléculaire, et notamment en génétique : séquençage, analyse de l'expression des gènes, des mutations génétiques…), le domaine médical (diagnostic médical, pharmacie), l'agroalimentaire, l'environnement…

A.I. Les biopuces

Le concept de biopuce est issu des travaux réalisés par Ekins *et al.* (1990, 1999) : ils ont été les premiers à effectuer des microdépôts sur un support plan pour y fixer des composés biologiques de façon bien localisée, dans le but d'analyser par interaction spécifique certains constituants d'un mélange.

Le principe d'un biocapteur est le suivant : des biomolécules *sondes* immobilisées sur un *support solide* vont permettre la détection par affinité de molécules *cibles* présentes dans un milieu complexe. La reconnaissance biologique est alors traduite en un signal physique mesurable.
Lorsque l'interaction entre une biomolécule sonde et sa cible se traduit simplement par un appariement, on parle dans ce cas de capteur d'affinité (puce à ADN, à anticorps…) ; lorsqu'elle conduit à la production d'une espèce chimique, on parle alors de capteur enzymatique (interaction enzyme/substrat).
La reconnaissance peut être révélée de façon directe ou indirecte : dans ce dernier cas, on détecte et mesure la réponse transmise par une espèce qui ne correspond ni à la sonde, ni à la cible, mais qui est associée à l'une des deux molécules en interaction (marqueurs fluorescents, radioactifs, …).

Le concept de biopuce sous-tend tout d'abord une miniaturisation, c'est-à-dire qu'on consomme à la fois peu de réactifs pour la mise en œuvre du biocapteur et que l'analyse est réalisée à partir d'une très faible quantité d'échantillon (l'ordre de grandeur est typiquement de 10 à 100 µL). Les biopuces permettent par ailleurs le multiplexage, c'est-à-dire qu'on peut analyser un très grand nombre d'éléments simultanément, au cours d'un même test.

Les critères qui définissent les performances d'un biocapteur sont : la spécificité vis-à-vis de molécules cibles bien précises, la sensibilité du point de vue de l'interaction mais également au niveau de la détection, la reproductibilité, la taille (miniaturisation) et la capacité de criblage, la stabilité, la réversibilité de l'interaction pour pouvoir réutiliser le biocapteur, la facilité de mise en œuvre et d'utilisation, et ce, à faible coût, la possibilité d'automatisation et de production à grande échelle.

Elaborer un biocapteur implique de maîtriser et de mettre en commun divers savoir-faire, dans des domaines aussi variés que le traitement de surfaces et les réactions physico-chimiques en phase hétérogène (choix et préparation du support, mode de fixation de la biomolécule sonde), la localisation des réactions sur des supports, les interactions biologiques (interaction entre la sonde et sa cible) et leur caractérisation (détection).

On distingue différents types de biopuces, tels que les puces à ADN [Podyminogin *et al.*, 2001], à carbohydrates [Lee & Shin, 2005[a]], à peptides [Melnyk *et al.*, 2002], à protéines [Wang & Jin, 2004] et notamment à anticorps [Gering *et al.*, 2002], à cellules [Uetz *et al.*, 2000], à tissus [Kononen *et al.*, 1998], etc.

Quelques applications de ces biocapteurs, ainsi que leur mise en œuvre (choix des supports, fixation des sondes) et les différentes méthodes analytiques les plus couramment utilisées pour la détection des interactions sonde/cible, vont être brièvement décrites à partir d'exemples tirés de la littérature.

A.I.1. Les puces à ADN

A.I.1.1. Rappels sur l'ADN

L'ADN contenu dans le noyau des cellules est le support de l'information génétique ; plus précisément, les gènes correspondent à des fragments d'ADN. Cette macromolécule est constituée de centaines de millions de molécules plus petites appelées nucléotides, lesquels comportent une base azotée, un pentose et un groupement phosphate. Il en existe 4 différents, qui sont désignés par les lettres A (adénine), T (thymine), G (guanine) et C (cytosine). Les molécules d'ADN sont composées de deux chaînes polynucléotidiques enroulées en spirale pour former une double hélice ; la cohésion entre les deux brins d'ADN est assurée par des liaisons hydrogène entre les bases azotées : A s'apparie avec T, et G avec C ; ce phénomène, appelé *hybridation*, est à l'origine de la technique des puces à ADN.

A.I.1.2. Principe des puces à ADN

Le principe de ces biopuces repose sur l'appariement de séquences complémentaires d'acides nucléiques : un fragment d'ADN simple brin (oligonucléotide) immobilisé sur un support va pouvoir reconnaître la séquence cible complémentaire présente dans l'échantillon à analyser. Les séquences cibles sont amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR : "Polymerase Chain Reaction") et sont généralement marquées avec une espèce fluorescente (*fluorophore*). Les supports correspondent à des surfaces planes ou poreuses, c'est-à-dire percées de puits ; ils sont de petite taille, de l'ordre du cm^2, et peuvent fixer jusque 400 000 sondes. Les puces à ADN peuvent ainsi être assimilées à des multi-détecteurs d'hybridations moléculaires entre séquences complémentaires d'acides nucléiques.

Deux approches peuvent être envisagées pour l'élaboration des puces à ADN :

- Les sondes oligonucléotidiques (ODN) sont directement synthétisées à même les supports (synthèse *in situ*) via des techniques basées sur la photolithographie [Fodor *et al.*, 1991 ; Reineke *et al.*, 2001], la microfluidique (microcanaux), ou encore la méthode dite "d'impression à jet d'encre".
- Les sondes ODN sont pré-synthétisées, puis greffées sur les supports [Beier & Hoheisel, 1999].

La première méthode permet une grande flexibilité au niveau de la conception de la puce ; l'inconvénient majeur réside dans le fait qu'il n'est pas possible d'effectuer des vérifications ou des purifications en cours de synthèse : il s'ensuit que les rendements obtenus sont faibles pour les ODN les plus longs.
C'est pourquoi, les sondes oligonucléotidiques sont généralement pré-synthétisées avant d'être immobilisées par des dépôts (0,1 à 10 nL) en des endroits bien localisés sur une surface, typiquement en verre : on crée ainsi sur un même support des milliers de nanoréacteurs.

Les puces à ADN constituent un outil aujourd'hui largement utilisé pour détecter, identifier et quantifier des séquences d'acides nucléiques, ou encore déceler les mutations génétiques. Cette technologie a permis d'accroître considérablement la rapidité et l'efficacité des

processus d'identification des gènes, par rapport à d'autres approches plus traditionnelles telles que le Northern blot ou la RT-PCR (PCR en temps réel).

Les applications de ces biopuces sont nombreuses et couvrent divers domaines tels que la génomique, la biologie moléculaire, le diagnostic médical, la pharmacie, l'agroalimentaire, l'environnement…

A.I.2. Les puces à protéines et à anticorps

L'information génétique ne renseigne pas complètement sur le fonctionnement d'un organisme : en effet, ce sont les protéines qui remplissent les diverses fonctions au sein des cellules (protéines de structure, de stockage, de transport, hormones, anticorps, enzymes, …). Ainsi, les enzymes ont une action très spécifique vis-à-vis d'un substrat donné et catalysent les réactions chimiques qui se produisent dans les milieux biologiques ; on peut citer comme autre exemple l'hémoglobine, qui est responsable du transport de l'oxygène dans le sang des vertébrés.

Or, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles et les taux d'ARNm ne permettent pas de déterminer dans quelles quantités elles vont être produites. C'est pourquoi, on préfère développer des puces à protéines plutôt que des puces à ADN, bien que leur mise en œuvre pose certains problèmes, notamment la perte d'activité biologique consécutive à l'immobilisation sur un support.

A.I.2.1. Les protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'acides aminés, lesquels sont assemblés selon un ordre bien déterminé par le code génétique ; il en existe en tout 20 différents chez l'homme.
L'ARNm sert d'intermédiaire entre l'information génétique portée par l'ADN et la synthèse effective des protéines. Celle-ci se décompose en deux étapes :

- la transcription : l'ADN est copié en ARNm
- la traduction : l'information portée par l'ARNm est décodée, ce qui permet l'assemblage des différents acides aminés selon un ordre bien précis, qui détermine la nature de la protéine synthétisée.

Les enjeux de la protéomique sont : 1) d'identifier les protéines présentes dans un échantillon biologique, 2) de déterminer la fonction de certaines d'entre elles, 3) de connaître les composés avec lesquels elles interagissent et de quelle manière, 4) de déterminer leur structure et celle de complexes protéiques.

Les tests ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") sont les premiers outils ayant permis d'analyser des protéines [Engvall & Perlman, 1971] : il s'agit d'une technique immuno-enzymatique de détection, qui permet de visualiser une interaction entre un anticorps et un antigène. Leur principe est le suivant : l'antigène présent dans l'échantillon à analyser est capté par l'anticorps qui est contenu dans un puits. Il va être détecté par un deuxième anticorps qui est marqué avec une enzyme (détection "sandwich") ; la réaction est ensuite révélée par ajout d'un substrat incolore qui est dégradé en un composé coloré dont on va pouvoir mesurer la concentration grâce à la spectrophotométrie. Ces tests sont réalisés sur des plaques constituées de 96 micropuits. Malgré ses nombreux avantages (sensible, spécifique, analyse simultanée de 96 échantillons, simple d'utilisation et dans sa mise en œuvre), elle nécessite un temps assez long pour le développement des analyses (3 à 5 heures) et consomme une grande quantité de réactifs et d'analytes.

Une autre méthode classiquement employée pour analyser les protéines associe l'électrophorèse 2D sur gel (2DE) à la spectrométrie de masse (MS) ; cette dernière permet par ailleurs de mesurer la masse des peptides issus d'une digestion enzymatique.

La chromatographie d'affinité permet quant à elle de séparer certains composés présents dans un milieu liquide, par interactions spécifiques avec des protéines immobilisées sur une surface poreuse.

Etant donné que la technologie des biopuces permet le criblage à haut débit pour l'analyse de composés variés, qu'elle requiert moins de matériel sonde et d'analyte, qu'elle est rapide, facile d'utilisation et qu'elle permet d'obtenir des résultats sans qu'il soit nécessaire de purifier auparavant les échantillons biologiques, elle constitue une méthode de choix pour l'analyse des protéines. Les challenges de la technique sont cruciaux : l'immobilisation des protéines sur les supports ne doit pas affecter leur activité biologique (propriétés de reconnaissance dans le cas de l'interaction spécifique entre un anticorps et un antigène, activité enzymatique, …), la fixation non spécifique d'espèces doit être minimisée et la détection doit être particulièrement sensible.

Les puces à protéines permettent d'analyser différentes espèces : leur fonctionnement repose sur l'interaction entre composés de diverses natures, qui se traduit par la formation de complexes anticorps/antigène, protéine/protéine, protéine/acide nucléique, protéine/lipide, etc. On distingue deux types de puces à protéines [Zhu & Snyder, 2003] :

- Les puces analytiques, qui servent à la détection de molécules présentes dans le milieu d'analyse. Leur principe repose sur la reconnaissance spécifique d'une espèce : il s'agit le plus souvent de puces à anticorps ou à antigènes.
- Les puces fonctionnelles permettent quant à elles d'étudier diverses interactions de type enzyme/substrat, protéine/protéine, protéine/lipide, etc., d'identifier des éléments pathogènes, ou encore de tester certains médicaments ; leur fonctionnement est basé sur l'activité biochimique des molécules immobilisées sur le support.

A.I.2.2. Les anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines particulières, qui sont secrétées par les cellules plasmatiques en réponse à l'introduction dans l'organisme d'une substance étrangère. Leur rôle est de détecter et de neutraliser des agents pathogènes tels que les bactéries et les virus ; leur action est basée sur la reconnaissance spécifique de molécules appelées antigènes. Il existe 5 grands groupes d'immunoglobulines : les IgG, IgA, IgM, IgE et IgD.

Les anticorps se composent de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (environ 440 acides aminés) et deux chaînes légères (environ 220 acides aminés), reliées par des ponts disulfures, pour former une structure en Y (Figure 1). Les deux chaînes lourdes sont

identiques, de même que les deux chaînes légères. Elles possèdent chacune des domaines dits "constants" car ils sont très ressemblants d'un anticorps à l'autre, et des domaines variables (zones hachurées sur la figure 1). On désigne par "région Fc", la partie qui n'est constituée que des chaînes lourdes ; la conjugaison des chaînes lourdes avec les chaînes légères correspond aux deux fragments Fab.

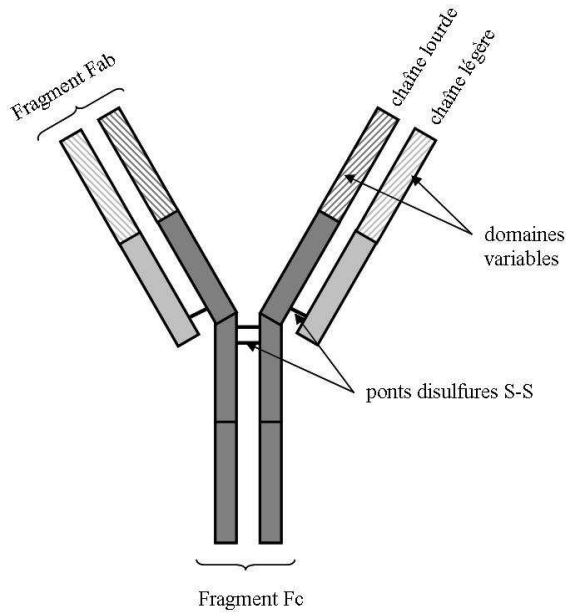


Figure 1 Structure d'un anticorps

Les domaines constants n'interviennent pas dans la reconnaissance de l'antigène ; l'association entre deux domaines variables, portés respectivement par une chaîne lourde et par une chaîne légère, constitue le site de reconnaissance de l'antigène, encore appelé *paratope* : une molécule d'anticorps possède ainsi deux paratopes identiques. L'antigène peut quant à lui posséder différents sites de liaison avec des anticorps, appelés *épitopes*.

Bien qu'elle soit hautement spécifique (image du système clé-serrure), la réaction entre un anticorps et un antigène est réversible, car les liaisons mises en jeu ne sont pas covalentes (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, interactions hydrophobes) : on peut par conséquent envisager de régénérer ce type d'immunocapteur (c'est-à-dire dissocier les complexes anticorps/antigène) en vue d'une éventuelle réutilisation.

Le principe de fonctionnement d'une puce à anticorps est schématisé sur la figure 2.

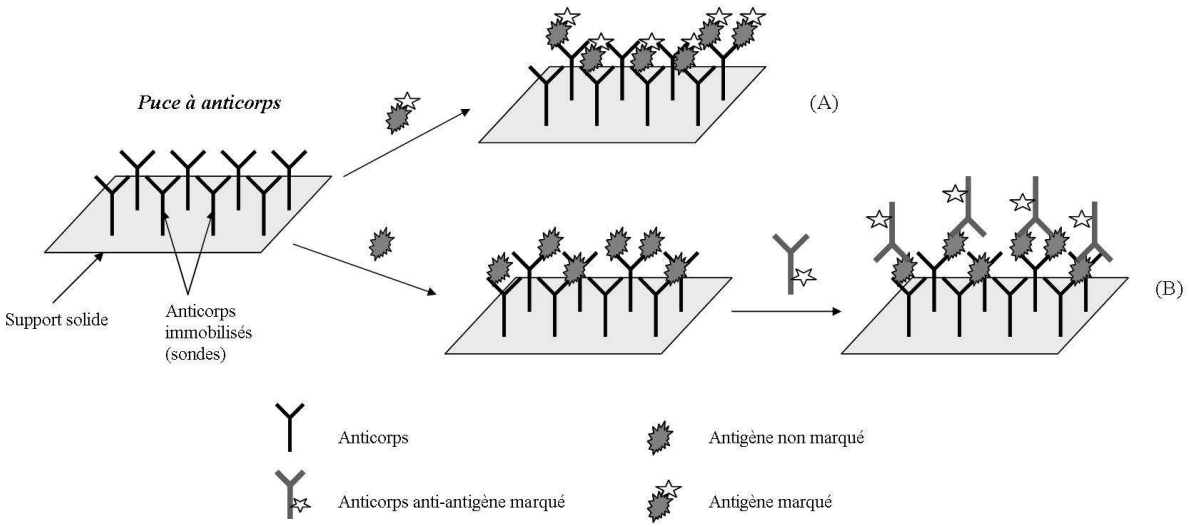


Figure 2 Principe de fonctionnement d'une puce à anticorps : antigène marqué avec un fluorophore (A), détection par un deuxième anticorps marqué avec un fluorophore (B)

Dans le cas schématisé ci-dessus, les anticorps sont représentés immobilisés via leur fragment Fc sur la surface du support et jouent le rôle de molécules sondes. La formation du complexe immunologique anticorps/antigène est détectée par fluorescence et peut être révélée de deux manières :

(A) L'antigène est marqué par un fluorophore.

(B) L'antigène n'est pas marqué : la détection se fait dans une seconde étape qui fait intervenir un deuxième anticorps anti-antigène, qui est lui marqué avec un fluorophore. Cette méthode est directement inspirée des tests ELISA.

Pour que l'antigène puisse être détecté dans le milieu d'analyse, il convient que l'anticorps soit correctement orienté sur le support, de telle sorte que les paratopes soient accessibles à l'antigène. C'est pourquoi, il est préconisé d'immobiliser les anticorps via leur fragment Fc [Vijayendran & Leckband, 2001 ; Hoffman & O'Shannessy, 1988 ; Prisyazhony *et al.*, 1988] et de préférence par l'intermédiaire d'un bras espaceur [Piehler *et al.*, 2000]. Or, ce fragment n'étant composé que de domaines constants portés par les chaînes lourdes, sa structure est, d'un point de vue global, commune à tous les anticorps appartenant à une même classe d'immunoglobulines. Par conséquent, les protocoles décrivant la fixation d'anticorps via le fragment Fc peuvent être généralisés aux différents anticorps d'un même groupe. On peut citer à titre d'exemple les méthodes mettant en jeu la protéine A ou la protéine G [Vijayendran & Leckband, 2001] : ces deux protéines, localisées au niveau de la membrane

des staphylocoques, présentent en effet une forte affinité vis-à-vis du fragment Fc des IgG [Goudswaard *et al.*, 1978 ; Akerstrom & Björck, 1986 ; Turkova, 1999].
Nous reviendrons plus en détail (cf. A.II.3. et A.II.4.) sur les différentes méthodes employées pour fixer les anticorps sur les supports.

A.I.3. Les puces à peptides

La mise en œuvre de ce type de biopuce est similaire à celle des puces à ADN, c'est-à-dire que les peptides peuvent être synthétisés *in situ* par adressage photochimique, comme ils peuvent être pré-synthétisés puis greffés sur les supports. Les applications qui sont faites de ce type de biocapteur sont là encore nombreuses et variées : Melnyk *et al.* (2002) ont ainsi développé un nouvel outil de diagnostic permettant de détecter dans le sang d'individus malades les anticorps spécifiques à 3 déterminants antigéniques peptidiques immobilisés sur un support. Houseman *et al.* (2002) ont quant à eux étudié l'interaction kinase/substrat (phosphorylation des peptides-sondes) ainsi que certains processus d'inhibition de l'activité enzymatique de cette protéine. Falsey *et al.* (2001), après avoir identifié un peptide capable de se fixer sur la surface de certaines cellules saines (WEHI-231) et d'induire la phosphorylation intracellulaire de la tyrosine, ont étudié les effets de l'adhésion cellulaire sur ce type de support. Lam et Zhao (1997) ont encore pu tester l'action thérapeutique de certains peptides au niveau de cellules cancéreuses.

A.I.4. Les puces à carbohydrates

Les puces à carbohydrates permettent d'étudier certaines interactions spécifiques carbohydrates/protéines, lesquelles sont souvent mises en jeu au cours de divers processus cellulaires. Les applications de ces biopuces vont de l'analyse haut-débit de ces interactions à la caractérisation de l'activité enzymatique de certaines protéines vis-à-vis de carbohydrates ou encore à la détection d'éléments pathogènes.
Les lectines sont des protéines qui ont pour particularité de se lier spécifiquement à des carbohydrates : Smith *et al.* (2003) ont ainsi immobilisé sur un support le mannose et le galactose, en vue d'étudier les interactions spécifiques avec deux lectines, respectivement la

concanavaline A et la jacaline. Lee et Shin (2005[a]) ont pu détecter la présence d'éléments pathogènes au sein de cellules *E. Coli* infectées (cibles), lesquelles expriment une protéine qui a pour propriété de se fixer sur le mannose (sonde).

Après ces quelques exemples d'applications démontrant l'intérêt des biocapteurs, nous présenterons différentes méthodes parmi celles les plus fréquemment employées dans la littérature pour immobiliser des biomolécules sondes sur divers types de supports.

A.II. Stratégies d'immobilisation des sondes sur différents types de supports

Le choix du support est fonction du type de biocapteur que l'on souhaite élaborer, de la nature de l'espèce biologique qui va jouer le rôle de molécule sonde, de la méthode qui va être employée pour détecter les interactions spécifiques entre la sonde et sa cible. Les biomolécules sondes peuvent être immobilisées via différents types de liaisons, covalentes ou non, sur une surface plane (2D), ou emprisonnées à l'intérieur d'un gel (3D). La chimie effectuée sur le support, ainsi que la préparation des sondes, doivent être à la fois simples et reproductibles pour permettre la production à grande échelle et le criblage haut-débit.

A.II.1. Les matériaux les plus utilisés

Les supports correspondent à des surfaces planes ou poreuses (percées de puits). Leurs propriétés physico-chimiques (stabilité chimique, résistance mécanique, propriétés optiques, etc.) doivent être en adéquation avec les conditions de mise en œuvre et d'utilisation du biocapteur ; elles doivent également être compatibles avec le mode de détection choisi. Très souvent, le support est fonctionnalisé, c'est-à-dire qu'on introduit sur sa surface des groupements fonctionnels pour permettre la fixation des sondes par liaison covalente.
Parmi les matériaux les plus utilisés, on peut citer le verre, le silicium ou des matériaux polymères :

- Le verre présente de nombreux avantages : il est peu onéreux, inerte, non polaire, mécaniquement stable et transparent (ce qui facilite la lecture en fluorescence). Il peut être fonctionnalisé par un silane ce qui permet d'introduire une fonction amine, ester, époxyde, etc., sur lesquelles on peut par la suite fixer un ligand bifonctionnel. Sa surface peut aussi être rendue adhésive, grâce par exemple à un dépôt de poly-L-lysine (PLL) [Haab *et al.*, 2001 ; Angenendt *et al.*, 2002, 2003].

- Le silicium est un matériau semi-conducteur, rigide et chimiquement inerte. Il peut être recouvert par une couche de silice silanisée [Volle *et al.*, 2003]. Il sert aussi de support à des métaux comme l'or ou l'argent, utilisés dans les techniques de détection de type SPR (cf. A.IV.1.3.a).

- Les polymères peuvent être produits facilement et en grande quantité selon différentes méthodes ; ils sont par ailleurs mécaniquement stables et relativement peu onéreux. Ce sont surtout des dérivés de polyacrylates, mais il peut aussi s'agir de polyéthylène [Kumar & Gupta, 2003], de polypropylène [Bader *et al.*, 1997], de polystyrène [Rasmussen *et al.*, 1991 ; Angenendt *et al.*, 2003], de polydiméthylsiloxane (PDMS) [Hyun & Chilkoti, 2001].

A.II.2. Immobilisation des sondes oligonucléotidiques

Les sondes oligonucléotidiques peuvent être synthétisées *in situ*, c'est-à-dire à même les supports, ou bien elles sont pré-synthétisées et sont alors terminées par une fonction permettant leur fixation ultérieure sur les supports.

Le type d'immobilisation choisi pour préparer des puces à ODN fait couramment interagir un support en verre à caractère électrophile avec une sonde ODN porteuse d'un groupement nucléophile : les ODN sont modifiés chimiquement de telle sorte qu'ils comportent un groupement alkylamine, et le verre peut être recouvert par silylation avec un époxysilane [Lamture *et al.*, 1994], un phénylisothiocyanate [Chen *et al.*, 1999], ou d'autres groupements à caractère électrophile, tels que les fonctions aldéhyde ou acide carboxylique [Zammatteo *et al.*, 2000]. Les supports présentant un recouvrement de type aldéhydique forment avec les fonctions amines des ODN des liaisons imine, qu'il convient de réduire pour plus de stabilité avec le borohydrure de sodium ($NaBH_4$) ou le cyanoborohydrure de sodium ($NaCNBH_3$). Les supports fonctionnalisés par un acide carboxylique nécessitent d'être activés sous forme d'esters de succinimidyle en présence d'un agent de couplage de type carbodiimide (EDAC.HCl, DIC, etc.).

Kumar et Gupta (2003) ont procédé à l'activation par le chlorure de trésyle de plusieurs types de surface (polypropylène 2D et 3D, polyéthylène 2D, polystyrène 3D, lames de verre) sur lesquelles les ODN ont pu être greffés via leurs fonctions amine ou thiol.

Les interactions mettant en jeu un support à caractère nucléophile et un ODN électrophile, sont également décrites. Certains auteurs ont procédé à l'oxydation de diols vicinaux par le periodate de sodium ($NaIO_4$) pour introduire une fonction aldéhyde sur des ODN : ces sondes ont ensuite été fixées sur du latex via une liaison hydrazone [Kremsky *et al.*, 1987] ou sur la poly-L-lysine par une réaction d'amination réductrice [Lemaitre *et al.*, 1987]. Podyminogin *et al.* (2001) ont greffé via une liaison semicarbazone stable des ODN modifiés avec un groupement benzaldéhyde sur des supports en verre fonctionnalisés par un silane comportant une fonction semicarbazide (semicarbazidopropyltriéthoxysilane).

Rubina *et al.* (2003) ont eux choisi d'emprisonner les sondes dans un gel de polyacrylamide : ils ont plus précisément réalisé la copolymérisation par induction photochimique du monomère acrylamide avec les sondes fonctionnalisées par des groupements méthacryliques, et ce, à même les supports en verre ou en silicium.

Certains auteurs suggèrent encore d'intercaler un bras espaceur entre les sondes et le support afin de rendre plus accessibles les groupements fonctionnels présents sur la surface : Benters *et al.* (2002) ont fixé des ODN sur des lames de verre par l'intermédiaire de dendrimères (polymères formés selon un processus arborescent) terminés par des groupements de type amidoamine.

A.II.3. Fixation des protéines sur les supports

Les protéines sont plus sensibles à leur environnement (pH, température, force ionique, concentration, nature du support…) que les acides nucléiques. Le principal problème rencontré lors de la fabrication de puces à protéines est la perte d'activité biologique consécutive à l'immobilisation sur le support, notamment dans le cas de surfaces hydrophobes en verre ou en plastique : en effet, lorsqu'elles sont adsorbées sur la surface ou greffées via une liaison covalente, elles peuvent subir des modifications conformationnelles du fait de leur

immobilisation et de la proximité avec la surface (gêne stérique, interactions avec le support) [Yeung *et al.*, 1997, 1999]. Le site actif peut en outre être rendu inaccessible : en effet, parce qu'elles sont particulièrement abondantes, les fonctions amine, et notamment les fonctions amine des résidus lysine, sont souvent utilisées pour greffer les protéines sur les supports. Or, étant donné que ces fonctions sont dispersées sur toute la surface de la molécule, les protéines sont immobilisées de façon aléatoire, ce qui implique que leur site actif n'est pas forcément correctement orienté et du même coup accessible.

Les protéines peuvent être immobilisées de différentes façons sur les supports : diffusion dans un gel, adsorption, fixation par affinité et fixation via une liaison covalente.

A.II.3.1. La diffusion dans un gel

Le support peut être recouvert de polyacrylamide [Wang et al., 2002[a]] ou d'agarose [Afanassiev et al., 2000] qui forment une matrice très poreuse et très hydrophile à l'intérieur de laquelle les protéines peuvent être piégées. Cette méthode permet d'augmenter la capacité de fixation des macromolécules sur le support puisqu'elles sont immobilisées à l'intérieur d'un volume. Elles sont par ailleurs très peu soumises à des modifications conformationnelles et l'environnement hydraté conféré par le gel restreint les processus de dénaturation.
Ce mode de fixation permet en conséquence d'abaisser le seuil de détection (davantage de macromolécules sondes immobilisées et actives), mais présente comme inconvénients que le recouvrement est plus inhomogène par rapport aux méthodes d'immobilisation sur une surface plane (2D) et que les résultats obtenus ne sont pas reproductibles. La diffusion des biomolécules sondes et cibles à l'intérieur de la matrice constitue un facteur limitant.

A.II.3.2. L'adsorption

Pour permettre l'adsorption des protéines, les surfaces en verre peuvent être recouvertes avec la PLL [Angenendt *et al.*, 2003] ou par une membrane en nitrocellulose [De Wildt *et al.*, 2000]. Les molécules sont alors fixées via des liaisons faibles sur le support (interactions hydrophobes et électrostatiques) et peuvent de ce fait en être facilement séparées. Par ailleurs, étant donné qu'elles sont immobilisées de façon aléatoire et du fait des interactions avec le support, très peu de protéines préservent leur activité biologique : d'après Haab *et al.* (2001), seulement 20 % des anticorps adsorbés sur la PLL conservent leurs propriétés de

reconnaissance ! Enfin, le bruit de fond est généralement très important car on observe beaucoup d'adsorption non spécifique sur la surface des supports.

A.II.3.3. La fixation par affinité

Les protéines sont immobilisées sur les supports par l'intermédiaire d'autres espèces avec lesquelles elles interagissent de façon spécifique. Ce mode de fixation par affinité fait souvent intervenir un couple de molécules bien particulières, la biotine et l'avidine, ou encore la protéine G ou la protéine A qui ont la propriété de se fixer spécifiquement au fragment Fc des IgG.

- ***Fixation par affinité via le complexe avidine/biotine***

La biotine, ou vitamine H, est une petite molécule qui est présente en petite quantité dans toutes les cellules vivantes. L'avidine est une glycoprotéine qui comporte 4 sous-unités identiques susceptibles de se lier spécifiquement avec la biotine. Il existe d'autres dérivés de l'avidine tels que la streptavidine et la NeutrAvidine, qui est elle élaborée par le groupe PIERCE. Ces deux dérivés interagissent de la même manière que l'avidine avec la biotine. Le complexe avidine/biotine correspond à l'interaction non covalente la plus forte existant entre une protéine et un ligand. La méthode consiste le plus souvent à faire interagir une protéine biotinylée avec l'avidine ou la streptavidine qui sont immobilisées sur un support.

Pavlickova *et al.* (2002) ont de cette manière immobilisé sur une surface en or des antigènes pour pouvoir détecter les anticorps présents dans le sérum d'individus malades : le support est dans un premier temps recouvert avec la biotine, sur laquelle on fait interagir la streptavidine, qui va fixer à son tour les antigènes biotinylés.

Peluso *et al.* (2003) ont comparé différents modes d'immobilisation des anticorps sur un support en or recouvert avec la streptavidine :

1) La biotine est activée sous forme d'ester de succinimidyle puis fixée sur les résidus lysines des anticorps via une liaison amide : la fixation des anticorps sur le support se fait dans ce cas de façon aléatoire.
2) Les anticorps sont biotinylés au niveau de leur fragment Fc via une liaison oxime (après oxydation des carbohydrates présents sur ce fragment) : les anticorps sont alors correctement orientés sur les supports (paratopes accessibles à l'antigène).

Ils ont également étudié différents modes de fixation des fragments Fab' des anticorps via le complexe streptavidine/biotine.

Vijayendran et Leckband (2001) ont immobilisé des anticorps biotinylés au niveau de leur fragment Fc sur des supports (fibres optiques en silice activée avec un silane) recouverts avec la streptavidine : le recouvrement n'est pas homogène lorsque cette dernière est fixée sur la surface via ses fonctions amines, contrairement au cas où elle est immobilisée sur le support préalablement recouvert avec la biotine.

- ***Fixation par affinité via la protéine G***

Ces mêmes auteurs ont également fixé des anticorps sur les supports via la protéine G (donc par leur fragment Fc). Le recouvrement est inhomogène lorsque celle-ci est immobilisée via ses fonctions amines [Vijayendran & Leckband, 2001].

Polzius *et al.* (1996) ont comparé différents modes de fixation de cette protéine sur un support en oxyde de tantale : les résultats les meilleurs sont obtenus lorsque la protéine G est biotinylée puis fixée sur le support recouvert avec l'avidine.

Ces deux modes de fixation par affinité, par la protéine G ou la protéine A d'une part, ou via le complexe avidine/biotine d'autre part, permettent d'orienter correctement les protéines, et notamment les anticorps, sur différents types de supports.

A.II.3.4. La fixation par une liaison covalente

La fixation par liaison covalente permet non seulement d'immobiliser les sondes via une liaison stable sur les supports, mais aussi de prédire leur orientation : il convient en effet de choisir judicieusement par quelles fonctions les protéines vont être liées au support, en fonction de leur localisation, de leur réactivité et de leur abondance. Les protéines sont soit greffées directement sur la surface des supports (le plus souvent préalablement fonctionnalisés), soit par l'intermédiaire d'un espaceur : l'utilisation d'un espaceur permet en effet d'atténuer les phénomènes d'adsorption non spécifique à la surface.
Les protéines peuvent être fixées sur les supports via leurs groupements amine, thiol, carbonyle ou acide carboxylique.

A.II.3.4.a Fixation par les fonctions amine

Parce qu'elles sont particulièrement abondantes, notamment au niveau des résidus lysine, on choisi très souvent d'immobiliser les protéines via leurs fonctions amine. La protéine interagit alors avec un support fonctionnalisé par des groupements aldéhyde, époxyde, hydroxyle activés avec un carbonyldiimide, ou encore acide carboxylique activés sous forme d'ester de succinimidyle.

De nombreux auteurs immobilisent ainsi les protéines sur différents types de supports par l'intermédiaire du ligand homobifonctionnel glutaraldéhyde (liaison imine) : dans ce cas, les supports en silice [Singh *et al.*, 1999], en silicium [Wang & Jin, 2004] ou en nitrure de silicium [Diao *et al.*, 2005] sont au préalable silanisés avec l'aminopropyltriéthoysilane (APTS). Arenkov *et al.* (2000) ont immobilisé les protéines à l'intérieur d'un gel en polyacrylamide via une liaison covalente stable : le gel est activé avec le glutaraldéhyde et les liaisons imines formées avec les fonctions amine des protéines sont réduites par $NaBH_4$.

Angenendt *et al.* (2003) ont fixé des protéines et des anticorps par l'intermédiaire d'espaceurs (dendrimères, polyéthylène glycols (PEG)) terminés par un groupement époxyde. Polzius *et al.* (1996) ont immobilisé la protéine G sur des supports en oxyde de tantale activés avec le glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS).

Pour fixer les protéines via une liaison amide sur les supports, on utilise le plus souvent un ligand bifonctionnel comportant un ou deux groupements de type succinimide :

- *Les ligands homobifonctionnels*, tels que le téréphtalate de disuccinimidyle ou le subérate de bis(sulfosuccinimidyle), sont fixés sur des supports classiquement activés avec un amino-silane [Volle *et al.*, 2003 ; Charles *et al.*, 2004].
- *Les ligands hétérobifonctionnels*, tels que le 4-(N-maléimidobutyrate) de succinimidyle (GMBS), sont eux fixés sur des supports silanisés par un mercapto-silane [Shriver-Lake *et al.*, 1997 ; Singh *et al.*, 1999 ; Vijayendran & Leckband, 2001]: il s'agit le plus souvent du 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MTS).

A.II.3.4.b Fixation par les thiols

On préfère fixer les protéines, et notamment les anticorps, via les thiols plutôt que par leurs fonctions amine, car ils sont moins répandus sur la molécule, et qu'il est alors plus facile de contrôler le site de fixation ; les thiols sont notamment présents au niveau des résidus cystéine. La méthode consiste à former une liaison thioéther avec un support fonctionnalisé par un groupement maléimide (Figure 3).

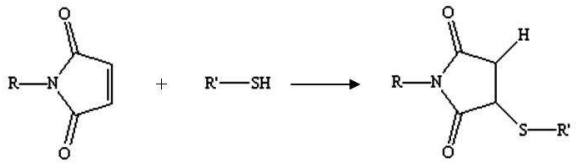


Figure 3 Formation d'une liaison thioéther entre un thiol et un groupement maléimide

A.II.3.4.c Fixation par les carbohydrates

On introduit par oxydation des fonctions alcool portées par les carbohydrates, une ou plusieurs fonction(s) aldéhyde dans la structure des protéines, pour pouvoir les fixer sur un support fonctionnalisé par un dérivé aminé (amine, hydrazide, semicarbazide, aminooxy).
O'Shannessy et Hoffman (1987) ont ainsi immobilisé via une liaison hydrazone stable, des glycoprotéines par les oligosaccharides (après oxydation par $NaIO_4$) sur un support recouvert d'agarose et activé par un hydrate d'hydrazine.
On trouve notamment dans la littérature beaucoup de références concernant le greffage orienté d'anticorps (après oxydation des carbohydrates présents sur le fragment Fc) sur des surfaces de type amino (cf. A.II.4.2.).

A.II.3.4.d Fixation par les fonctions acide carboxylique

Les fonctions acide carboxylique, présentes sous forme d'acide glutamique et aspartique, peuvent réagir après activation avec le N-hydroxysuccinimide sur des supports fonctionnalisés par un groupement de type amino. Les anticorps peuvent être immobilisés de cette manière via les –COOH portés par le fragment Fc.

A.II.4. Greffage orienté des anticorps sur les supports

Dans ce paragraphe, nous décrirons plus particulièrement les diverses stratégies envisagées en vue de réaliser la fixation d'anticorps sur les supports par une liaison covalente. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'immobilisation par leur fragment Fc est privilégiée pour que les sites de liaison avec l'antigène soient accessibles. Pour ce faire, le greffage est le plus souvent réalisé via les thiols ou via les carbohydrates présents sur ce fragment après oxydation par le periodate de sodium. En effet, greffer les anticorps par les fonctions amine conduit à un positionnement aléatoire, étant donné qu'elles sont réparties sur toute la molécule et notamment au niveau des paratopes.

A.II.4.1. Greffage orienté des anticorps par les sulfhydryles

Ces fonctions sont naturellement présentes au niveau des résidus cystéines, mais on peut également les introduire de façon plus localisée après réduction des ponts disulfures. Ceux-ci relient les chaînes lourdes aux chaînes légères au niveau des fragments Fab, et les deux chaînes lourdes du fragment Fc (cf. Figure 1). Pour réduire tous les ponts disulfure il faut utiliser des agents de réduction forts, ce qui conduit généralement à dénaturer l'anticorps. Il est préférable de réduire uniquement les ponts disulfures présent au niveau de la région charnière du fragment Fc : pour ce faire on utilise la 2-mercaptoéthylamine (2-MEA) ou le dithiothreitol (DTT). Certains réactifs permettent par ailleurs d'introduire ce type de fonction au niveau des résidus lysine : on peut citer le réactif de Traut (2-iminothiolane.HCl), le SATA ("succinimidyl (acetylthio)acetate") et le Sulfo-LC-SPDP ("sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate"). Des exemples utilisant ces différents réactifs sont présentés ci-après.

Vikholm et Albers (1998) ont réalisé le greffage orienté de fragments Fab' d'anticorps sur un support en silicium, via un espaceur lipidique fonctionnalisé avec un groupement maléimide ou un dérivé dithiopyridyl : pour ce faire, les ponts disulfures ont été réduits par le DTT au niveau de la région charnière.

Pope et al. (1996) ont introduit sur des anticorps, au niveau de leur fragment Fc, des groupements sulfhydryles permettant leur greffage sur des nanoparticules de polypyrrole via

un ligand hétérobifonctionnel : le sulfo-SMCC ("sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate").

Ce mode de fixation qui fait intervenir le sulfo-SMCC est également décrit par le groupe PIERCE (Figure 4) :

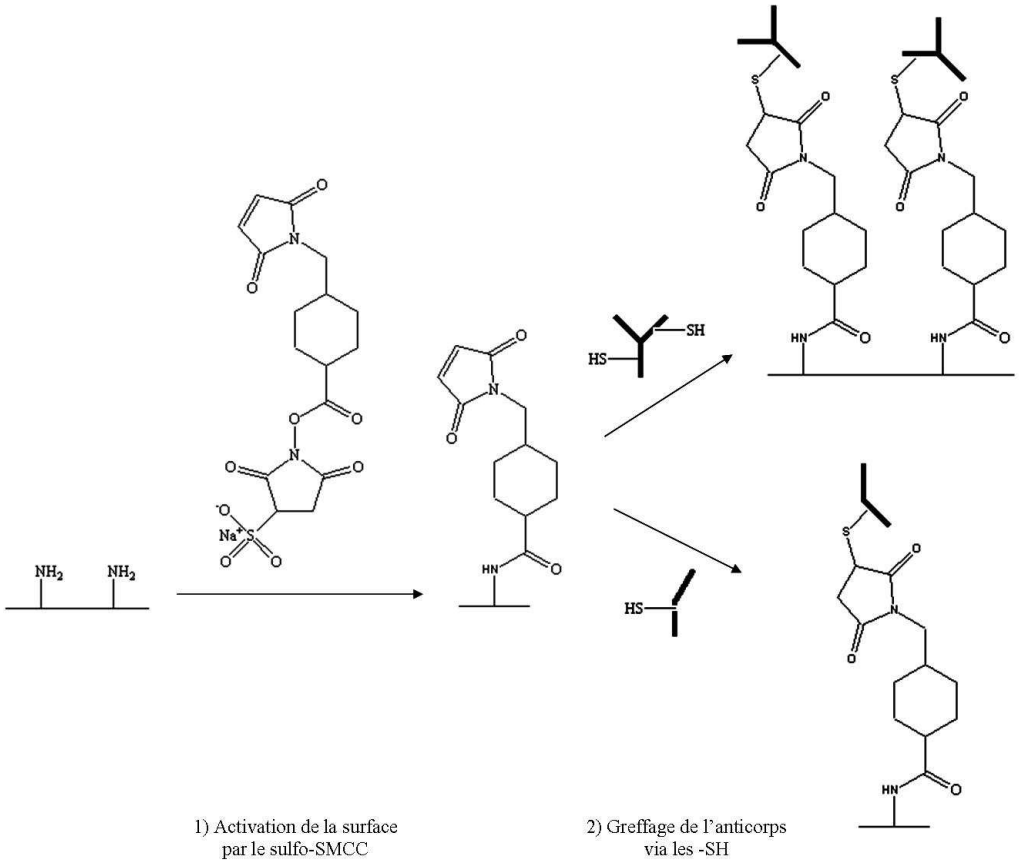


Figure 4 Greffage orienté d'anticorps sur un support aminé via le sulfo-SMCC [PIERCE]

A.II.4.2. Greffage orienté d'anticorps par les carbohydrates du fragment Fc

Une ou plusieurs fonctions aldéhyde peuvent être introduites au niveau du fragment Fc des anticorps par coupure oxydative des diols vicinaux des carbohydrates par le periodate de sodium. Les anticorps sont alors greffés sur des supports de type amino par une liaison covalente (exemple en Figure 5).

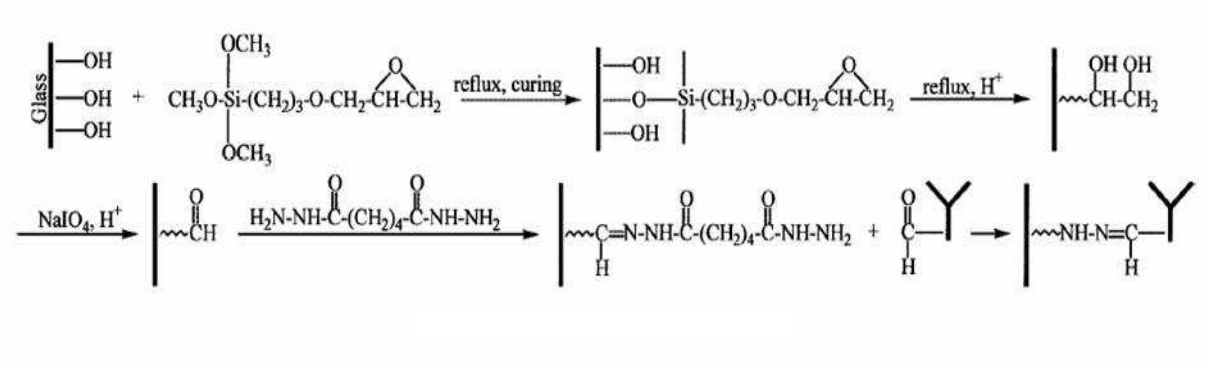


Figure 5 Fixation des anticorps (après oxydation) par leur fragment Fc sur un support en verre fonctionnalisé par un groupement hydrazide [Gering *et al.*, 2002]

A titre d'exemple, nous avons référencé dans le tableau ci-dessous différentes méthodes selon lesquelles les anticorps sont greffés via leur fragment Fc sur les supports :

Support	Liaison formée avec l'anticorps oxydé	Référence
Quartz ou verre silanisé avec le GPTS + acide adipique dihydrazide	hydrazone	Gering *et al.* (2002)
Gel polyacrylamide : substitution partielle des fonctions amide par des fonctions hydrazide	hydrazone	Arenkov *et al.* (2000)
Laine de verre silanisée avec l'APTS	imine	Nisnevitch *et al.* (2000)
Silicium silanisé avec l'APTS	imine, réduite par $NaBH_4$	Weiping *et al.* (1999)
Support recouvert avec de la cellulose activée par une fonction hydrazide	hydrazone	Vankova *et al.* (1998)
Lame de verre ou fibre optique silanisée avec le MTS + ligand maléimide/hydrazide ou disulfure/hydrazide	hydrazone	Shriver-Lake *et al.* (1997)
Silice activée + ligand dihydrazide	hydrazone	Ruhn *et al.* (1994)

Tableau 1 Greffage d'anticorps oxydés sur des supports fonctionnalisés par des groupements amino ou hydrazide

On remarque qu'on forme le plus souvent des liaisons de type hydrazone. Par ailleurs, étant donné que les liaisons imine sont peu stables, il est recommandé de procéder à leur réduction par $NaBH_4$ ou $NaCNBH_3$.

A.II.4.3. Fixation orientée par affinité

Nous avons vu au paragraphe II.3.3., qu'il était possible de fixer les anticorps sur les supports par affinité, via leur fragment Fc, par l'intermédiaire de la protéine G ou de la protéine A, ou via le complexe avidine/biotine (anticorps biotinylés au niveau du fragment Fc).

A.II.5. Immobilisation des peptides sur les supports

Les peptides sont synthétisés *in situ* par adressage photochimique, ou alors ils sont pré-synthétisés et terminés par un groupement fonctionnel par lequel il sera possible de les fixer sur les supports.

Ainsi, Falsey *et al.* (2001) ont greffé sur des lames de verre fonctionnalisées par un groupement glyoxylique, des peptides activés par une fonction aminooxy, via une liaison stable de type oxime. Les applications qui sont faites de ce biocapteur concernent entre autres l'étude de la phosphorylation de la tyrosine au niveau de cellules saines immobilisées sur le support. Pour empêcher les phénomènes d'adsorption cellulaire non spécifique à la surface, les auteurs préconisent d'intercaler un espaceur de type polyoxyéthylène entre les peptides et le support.

Melnyk *et al.* (2002) ont fixé des déterminants antigéniques peptidiques sur des lames de verre, via une liaison stable semicarbazone : les peptides sont ici activés par un groupement glyoxylique et le support par une fonction semicarbazide. Ces peptides vont permettre de détecter spécifiquement certains anticorps présents dans le sang d'individus malades (Figure 6).

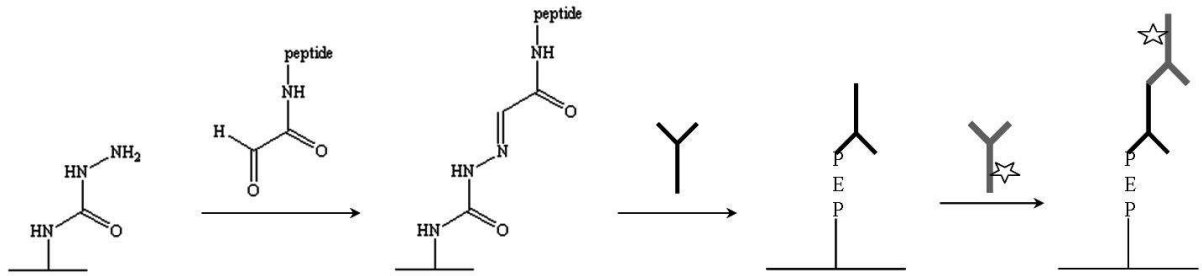


Figure 6 Peptides greffés via une liaison semicarbazone sur des lames de verre
Application à la détection d'anticorps présents dans le sang d'individus malades [Melnyk *et al.*, 2002]

La formation du complexe immun est révélée par un 2ème anticorps fluorescent.

A.II.6. Immobilisation des carbohydrates sur les supports

Les carbohydrates sont immobilisés sur les supports par des liaisons covalentes, ou via des interactions électrostatiques et hydrophobes.

Wang *et al.* (2002[b]) ont par exemple fixé par des liaisons non covalentes des polysaccharides sur des lames de verre recouvertes avec de la nitrocellulose.

Smith *et al.* (2003) ont immobilisé sur des surfaces en or deux carbohydrates modifiés avec des groupements sulfhydryles, via une chaîne carbonée terminée par un groupement pyridyl disulfure. De cette manière, il est possible de régénérer les supports, en procédant à la réduction par le DTT des ponts disulfures liant les sucres à la surface.

Lee et Shin (2005[a]) proposent deux méthodes pour fixer des carbohydrates par une liaison covalente sur des lames de verre, via un espaceur de type polyoxyéthylène : par une liaison de type hydrazone (bras espaceur terminé par une fonction hydrazide) ou par une liaison oxime (bras espaceur terminé par une fonction aminooxy).

Les mêmes auteurs ont aussi immobilisé des carbohydrates modifiés avec des groupements maléimides ou hydrazides sur des surfaces en verre fonctionnalisées respectivement avec des thiols ou des époxydes [Lee & Shin, 2005[b] ; Park *et al.*, 2002, 2004].

A.III. Localisation des greffages sur les supports

De nombreuses méthodes de localisation des greffages sur les supports sont décrites dans la littérature. Ces méthodes font appel à des techniques photochimiques (déprotection de groupes photolabiles, utilisation de résines photosensibles) permettant dans certains cas d'opérer des modifications localisées des propriétés de surface des supports (hydrophilie/hydrophobie), mais aussi à des techniques électrochimiques (les sondes sont fixées sur des microélectrodes) ou à la microfluidique (adressage des liquides à travers des microcanaux). Les dépôts peuvent être également localisés par microcontact (microtamponnage), par électrovaporisation, par la méthode d'impression à jet d'encre, ou ils peuvent être plus basiquement confinés à l'intérieur de puits physiques.
Nous allons à présent décrire quelque unes de ces méthodes.

A.III.1. Localisation par des techniques photochimiques

On distingue les méthodes basées sur l'utilisation de groupes photolabiles, de celles mettant en œuvre une résine photosensible.

A.III.1.1. Utilisation de groupes photolabiles

Un groupe photolabile est une molécule qui possède au sein de sa structure une liaison chimique qui peut être coupée lorsqu'elle est irradiée à une longueur d'onde appropriée : c'est la photolyse. La liaison chimique dont il est question est qualifiée de photolabile. Les groupes photolabiles sont généralement utilisés pour protéger certaines fonctions chimiques. Ils sont notamment utilisés dans les procédés de synthèse *in situ* des puces à ADN.

La technique développée par Affymetrix permet de synthétiser les sondes oligonucléotidiques, base après base, sur des bandes de surface : on répète plusieurs fois le même cycle, au cours duquel on déprotège sélectivement certains groupes photalabiles, à la suite de quoi on réalise le couplage des nucléotides. L'irradiation des groupes photolabiles se fait de façon localisée grâce à des masques photolithographiques.

On trouve également dans la littérature quelques références relatives à la synthèse par adressage photochimique de peptides sur des supports recouverts de cellulose [Frank, 1992], ou sur des lames de verre fonctionnalisées [Fodor *et al.*, 1991].

Shin *et al.* (2003) ont étudié le couple biotine/streptavidine pour modéliser les interactions ligand/protéine : la biotine est greffée sur des lames de verre silanisées (APTS), via un espaceur de type polyéthylène glycol terminé par le groupe photolabile NVOC (6-nitrovératryloxycarbonyle). Les sites réactionnels (-NH_2) sont régénérés en certains endroits bien définis par des irradiations localisées (Figure 7) réalisées via un système optique complexe comprenant un réseau de micromiroirs (MMA).

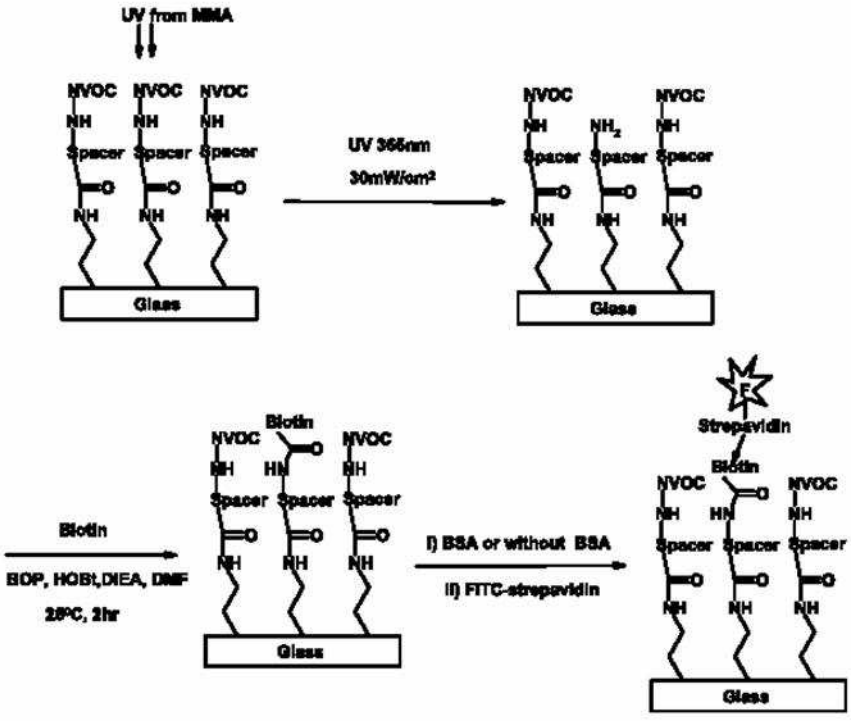


Figure 7 Greffage localisé de la biotine sur des lames de verre silanisées : irradiation du groupe photalabile NVOC [Shin *et al.*, 2003]

Ko *et al.* (2005) ont également procédé à des irradiations pour localiser les sites réactionnels où seront greffés des anticorps : après avoir recouvert une surface en or d'hexadécanethiol, ils ont réalisé des irradiations à travers un photomasque constitué de 25 trous (matrice 5×5 trous, d = 1 mm). L'acide 11-mercaptoundécanoïque est ensuite fixé au niveau des sites déprotégés, puis activé sous forme d'ester de succinimidyle pour permettre le greffage des anticorps. Les greffages sont réalisés par des dépôts : étant donné que les

propriétés de surface diffèrent entre l'intérieur (acide activé, hydrophile) et l'extérieur des puits (alcanethiol, hydrophobe), les dépôts restent bien localisés.

A.III.1.2. Utilisation d'une résine photosensible

Pour confiner les réactifs en des endroits bien localisés, on peut soit délimiter les zones de synthèse entre des murs en polymère fabriqués à partir d'une résine photosensible hydrophobe, soit réaliser des matrices de puits à l'intérieur desquels on va pouvoir effectuer des dépôts.

Le Proust *et al.* (2000) ont fabriqué sur des supports en verre des matrices de puits carrés ou circulaires (d = 300, 900 ou 1 200 µm), réalisés par photolithographie à partir d'une résine photosensible polyimide (hydrophobe). La silanisation est réalisée à l'intérieur des puits par immersion des supports dans une solution ; le polymère est ensuite enlevé avec des solvants, après quoi la fonctionnalisation se poursuit au niveau des sites silanisés. Les applications qui sont faites de ce biocapteur concernent la synthèse *in situ* d'ODN, par adressage photochimique, en utilisant des groupes photolabiles protecteurs.

Schneider *et al.* (2000) ont procédé d'une manière différente : ils ont fabriqué des plots en polymère sur une surface en nitrure de silicium. Après avoir désactivé les zones extérieures aux plots avec le perfluorosilane, le polymère est décollé et le silane GOPS (3-glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane) est greffé à l'emplacement des plots, pour permettre la fixation d'anticorps.

A.III.2. Fabrication de micropuits et de microcanaux en PDMS

Hyun et Chilkoti (2001) ont développé une méthode de localisation des greffages basée sur la modification des propriétés de surface d'un matériau. Ils ont fabriqué par moulage des micropuits ou microcanaux en PDMS (30 µm de large), qu'ils ont rendu hydrophiles par oxydation avec un plasma O_2, la surface à l'extérieur de ces motifs étant rendue hydrophobe par adsorption d'hexadécanethiol. Les dépôts restent alors confinés à l'intérieur des micropuits hydrophiles, ou bien les liquides sont adressés à travers les microcanaux délimités par des bandes de surface hydrophobes.

Smith *et al.* (2003) ont immobilisé des carbohydrates en des endroits bien localisés sur des surfaces en or, via des microcanaux en PDMS.

Taitt *et al.* (2002) ont développé une méthode permettant d'analyser simultanément et sur un même support, divers composants présents dans différents échantillons. 3 mélanges différents comprenant chacun 3 anticorps (sondes) sont adressés sur 3 rangées parallèles à travers des canaux en PDMS : les 9 anticorps sondes sont greffés sur le support via le complexe NeutrAvidine/biotine (anticorps biotinylés). 3 échantillons distincts d'anti-anticorps (cibles) sont adressés via d'autres canaux sur 3 rangées, perpendiculairement à celles où ont été immobilisées les sondes. Le principe de cette méthode est schématisé sur la figure 8 :

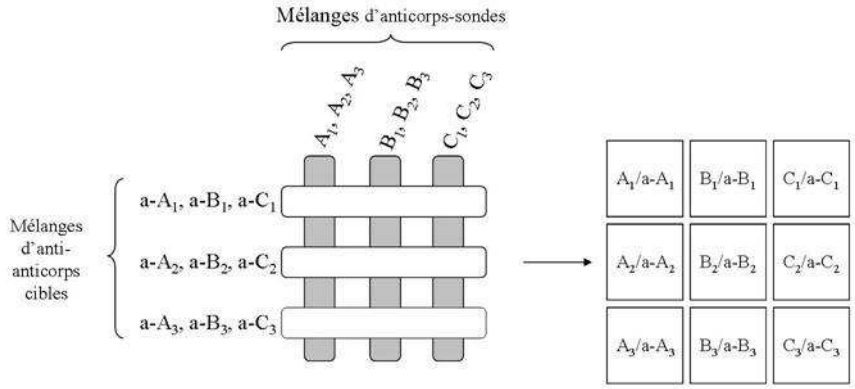


Figure 8 Principe de la méthode de localisation des réactions développée par Taitt *et al.* (2002)

Ils ont ainsi pu détecter jusqu'à 9 anti-anticorps différents répartis dans 3 échantillons.

A.III.3. Localisation par des techniques de microcontact

Le microtamponnage ("micro-contact printing") compte parmi les techniques les plus fréquemment utilisées pour localiser des greffages sur une surface [Xia & Whitesides, 1998 ; Lahiri *et al.*, 1999]. Cette méthode a pour principe le transfert par contact de molécules adsorbées sur un tampon, vers la surface d'un support. Elle a pour inconvénient qu'il est difficile de contrôler avec précision la quantité de réactifs transférés.

Lee *et al.* (2003) ont développé une technique similaire dans son principe : ils ont modifié chimiquement des pointes en nitrure de silicium utilisées en microscopie à force atomique (AFM), de telle sorte qu'elles soient recouvertes d'un film hydrophile qui va permettre l'adsorption de protéines (IgG) sur cette surface. Les protéines sont ensuite

transférées par contact, de la pointe AFM vers une surface en or (adsorption via les résidus cystéine). Cette méthode permet de réaliser des dépôts parfaitement localisés, à l'échelle nanométrique.

A.III.4. Localisation par des techniques basées sur l'éjection de molécules

Ces méthodes ont pour principe l'éjection de réactifs vers la surface d'un support ; il peut alors s'agir de dépôts liquides ou en phase vapeur.

La technique d'impression à jet d'encre ("ink-jet printing") a pour principe l'éjection d'une goutte de liquide à l'extérieur d'un réservoir, vers la surface d'un support : une matrice d'injecteurs permet de déposer en parallèle la même quantité de différents réactifs en des endroits bien localisés. Dugas *et al.* (2005) ont développé une technique similaire pour effectuer des dépôts d'ODN sondes en solution (10 nL) sur un support fonctionnalisé : ce dernier, disposé sur une platine de translation xy, se déplace sous l'éjecteur pour permettre la discrétisation des dépôts.

Il existe également des procédés permettant de réaliser des dépôts par électrovaporisation tels que l'ESD ("electrospray deposition"). Les molécules sont vaporisées avec un faible taux d'humidité (inférieur à 30 %) à travers un masque percé de trous. Les dépôts réalisés de cette manière mesurent quelques micromètres de diamètre. Cette technique est rapide et consomme très peu de réactifs (100 pg de protéines contre 1 µg dans le cas de plaques standard à 96 puits, soit le 10 000ème !). Avseenko *et al.* (2002) ont ainsi pu fixer 28 protéines différentes sur une surface mesurant 0,6 × 0,6 mm^2.

A.IV. Détection des interactions sonde/cible

Les analyses effectuées visent d'une part à détecter et à quantifier les interactions biomoléculaires qui se produisent à la surface du biocapteur, et d'autre part à caractériser les supports au cours de leur préparation, en terme de modification de leurs propriétés physico-chimiques (propriétés optiques, rugosité, mouillabilité, etc.). Ces techniques doivent être à la fois sensibles, précises, rapides et simples d'utilisation.
L'analyse des interactions entre la sonde et sa cible peut être réalisée de manière directe (sans marqueurs) ou indirecte : dans ce dernier cas, une, voire les deux molécules impliquées dans l'interaction, sont couplées à d'autres espèces qui vont permettre de révéler leur présence (marqueurs fluorescents et radioactifs, enzymes, …).
Il existe de nombreuses méthodes d'analyse ; nous allons décrire brièvement celles parmi les plus fréquemment utilisées.

A.IV.1. Méthodes d'analyse directe

Ces méthodes, utilisées pour détecter les interactions sonde/cible, peuvent également rendre compte des modifications effectuées à la surface du support lorsqu'on procède à son activation et à la fixation des ligands et des sondes.

A.IV.1.1. Microbalance piézoélectrique (QCM)

Une microbalance piézoélectrique, ou microbalance à cristal de quartz (QCM : "Quartz Crystal Microbalance"), permet de mesurer de très faibles variations de masse à la surface d'un cristal de quartz piézoélectrique. On applique une tension sinusoïdale entre deux électrodes disposées de part et d'autre du cristal, qui va alors osciller à une certaine fréquence (effet piézoélectrique inverse). Celle-ci étant directement corrélée à sa masse, tout ajout ou retrait de matière sur sa surface qui se traduit par une différence de masse, entraîne une variation de la fréquence de résonance du cristal, qui correspond à la grandeur mesurée.

A.IV.1.2. La microscopie à force atomique (AFM)

Cette technique de microscopie à champ proche permet de caractériser des états de surface en terme de rugosité. Une pointe fine en nitrure de silicium montée sur un microlevier balaye l'échantillon qui est porté par un ensemble de translateurs piézoélectriques. Le balayage consiste à déplacer l'objet et non la sonde. La pointe est soit mise en contact avec la surface (mode contact), soit est placée à quelques Angströms de cette dernière (mode attractif). Un faisceau laser dirigé sur l'extrémité du microlevier est réfléchi vers une photodiode à deux ou quatre cadrans : la déflexion du microlevier provoquée par la présence d'une aspérité se traduit alors par un déplacement du faisceau sur la photodiode. Cette technique permet de réaliser des images topographiques des surfaces analysées.

A.IV.1.3. Méthodes optiques utilisant les ondes évanescentes

Lorsqu'une onde lumineuse se propageant dans un milieu d'indice n_1 arrive à l'interface d'un milieu d'indice n_2 plus petit, cette onde sera réfléchie totalement si l'angle d'incidence est supérieur à un angle critique θ_c qui est fonction des deux indices. Cependant, la lumière réfléchie pénètre sur une courte distance dans le milieu d'indice n_2, générant une onde évanescente dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance par rapport à l'interface. Cette onde ne se propage pas, mais reste confinée au voisinage de l'interface sur une profondeur de quelques nanomètres. On peut ainsi mesurer en temps réel des modifications de l'indice de réfraction, d'épaisseur de couche, de fluorescence des molécules présentes à la surface…
De nombreuses techniques analytiques utilisent les ondes évanescentes : la microscopie TIRF, la résonance des plasmons de surface, l'ellipsométrie, l'interférométrie, les miroirs résonants, etc.

A.IV.1.3.a <u>La résonance des plasmons de surface (SPR)</u>

Cette méthode permettant de caractériser des films minces, est très largement utilisée pour la détection des greffages sur les supports (immobilisation des sondes et interactions sonde/cible). On détecte une variation d'indice de réfraction à l'interface entre deux milieux, consécutive à la fixation d'un ligand sur un récepteur, qui est lui-même immobilisé sur un support métallique (or, argent…). Le plasmon de surface correspond à une onde à

décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface parallèlement à laquelle elle se propage. Le champ électromagnétique dans le milieu biologique présentant un caractère d'onde évanescente, la fixation de molécules sur l'interface va modifier les caractéristiques de l'onde. On mesure en pratique les variations de phase ou d'amplitude du faisceau réfléchi.

A.IV.1.3.b L'ellipsométrie

Cette technique d'analyse de surface très sensible a pour principe la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane. Elle permet de caractériser un matériau du point de vue de ses propriétés optiques et/ou l'épaisseur de couches minces. L'onde incidente, polarisée linéairement, change d'état de polarisation après réflexion sur l'échantillon à analyser et devient elliptique. Le degré d'ellipticité est fonction des propriétés physiques du matériau.

A.IV.2. Méthodes d'analyse indirecte

Ces méthodes font intervenir une, voire plusieurs autres espèces, qui vont permettre de révéler les interactions spécifiques sonde/cible. On détecte un signal (fluorescence, luminescence, radioactivité, …) supposé proportionnel à la concentration en molécules cibles qui ont été captées. Ces dernières sont soit elles-mêmes marquées, soit on fait intervenir une 3ème espèce qui est-elle marquée et qui va reconnaître spécifiquement la cible (méthode "sandwich").

A.IV.2.1. Les techniques fluorimétriques

Certaines molécules ont la propriété d'émettre de la fluorescence quand elles sont excitées à une longueur d'onde appropriée. Il existe plusieurs méthodes analytiques basées sur ce principe : on distingue les mesures en champs proche (microscopie TIRF), des mesures en champs lointain (spectroscopie et microscopie à fluorescence, analyse par fibre optique, …). La grandeur mesurée est l'intensité de fluorescence qui est en première approximation proportionnelle à la concentration des espèces fluorescentes. Ces techniques sont à la fois très sensibles et hautement spécifiques.

Nous nous contenterons dans cette partie de présenter deux méthodes qu'on retrouve citées dans la littérature : la microscopie TIRF et l'amplification circulaire (RCA). Le principe de la fluorescence ainsi que les deux techniques analytiques utilisées au cours de notre étude, à savoir la spectroscopie et la microscopie à fluorescence, seront décrits dans la prochaine partie et de façon plus approfondie en annexe (cf. Annexe 1).

A.IV.2.1.a La microscopie TIRF

La microscopie TIRF ("Total Internal Reflection Fluorescence") est aussi appelée microscopie à onde évanescente. Un fluorophore se trouvant dans la zone de champ évanescent, peut absorber des photons et émettre de la fluorescence : étant donné que l'intensité de l'onde évanescente décroît exponentiellement avec la distance, les molécules reçoivent de moins en moins de lumière à mesure qu'elles sont situées à une plus grande distance de l'interface.

A.IV.2.1.b L'amplification circulaire (RCA)

L'amplification circulaire (RCA : "Rolling Circle Amplification") permet de détecter la formation de complexes biologiques résultant d'une interaction spécifique, par un procédé d'amplification d'une sonde ODN circulaire. La détection fait intervenir 5 étapes :

1- on passe l'échantillon à analyser sur le biocapteur : les biomolécules cibles interagissent avec les anticorps sondes qui sont immobilisés sur le support,
2- la formation du complexe immun est détectée par un deuxième anticorps biotinylé qui vient se fixer sur l'antigène,
3- ce deuxième anticorps est lui-même détecté par un troisième anticorps universel anti-biotine, qui est couplé à une sonde oligonucléotidique circulaire sur laquelle est fixée une amorce,
4- l'ADN polymérase réalise une extension de l'ODN à partir de cette amorce,
5- le fragment oligonucléotidique qui a été étendu est détecté par hybridation avec un ODN complémentaire marqué avec un fluorophore.

A.IV.2.2. La chimiluminescence

La chimiluminescence correspond à l'émission de luminescence générée au cours d'une réaction chimique : on forme un composé qui est activé et qui va se relaxer en émettant de la lumière. On peut citer comme exemple l'oxydation enzymatique du luminol. Dans le cadre des puces à protéines, la chimiluminescence est généralement utilisée pour la détection de type "sandwich" : les biomolécules cibles captées par les sondes, sont spécifiquement reconnues par un anticorps qui est marqué par une enzyme ; l'oxydation d'un substrat tel que le luminol produit ensuite une émission prolongée de lumière qui est récupérée et analysée au moyen d'une caméra CCD.

A.IV.2.3. La détection chromogénique

Cette méthode repose sur la dégradation enzymatique d'un substrat en un composé coloré dont on va pouvoir mesurer la concentration par spectrophotométrie (cf. tests ELISA). Les interactions sonde/cible sont détectées par la méthode "sandwich" : les biomolécules cibles sont marquées par un substrat et vont être reconnues spécifiquement par une troisième espèce qui est marquée par une enzyme.

A.IV.2.4. Utilisation de marqueurs radioactifs

Certaines protéines sont marquées avec des éléments radioactifs : ^{32}P, ^{125}I, ^{131}I, ^{14}C, ^{35}S, ^{3}H. La détection est réalisée par radiographie et quantifiée par densitométrie. Ces méthodes tendent à être progressivement remplacées car elles présentent un risque de contamination radioactive et posent le problème de la gestion des déchets.

A.IV.2.5. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM)

Cette méthode permet d'obtenir une cartographie de l'échantillon analysé. Son principe est basé sur l'interaction électron/matière : chaque point de la surface est soumis à un faisceau d'électrons dits *primaires*, en réponse à quoi l'échantillon réémet des électrons qualifiés de *secondaires* qui sont accélérés vers un détecteur. On mesure ainsi un signal électrique qui est amplifié. Cette technique peut être utilisée pour la détection de protéines immobilisées sur un biocapteur : les protéines cibles sont dans ce cas marquées avec de l'or.

A.IV.3. Récapitulatif des différentes techniques d'analyse les plus utilisées

Nous avons regroupé dans le tableau présenté ci-dessous, quelques références bibliographiques concernant l'utilisation de ces différentes méthodes analytiques :

Support utilisé	Caractérisation	Méthode analytique	Référence
verre	Interactions carbohydrate/protéine	Fluorescence	Lee & Shin (2005[a])
nitrure de silicium	*Immobilisation des protéines sondes*	*Chimiluminescence*	Diao *et al.* (2005)
silicium	*Immobilisation des protéines sondes*	*Ellipsométrie*	Wang & Jin (2004)
verre	Interactions anticorps/antigène	RCA	Perlee *et al.* (2004)
or	*Immobilisation des anticorps sondes* et interactions anticorps/antigène	SPR et fluorescence	Kwon *et al.* (2004)
or	Interactions carbohydrate/protéine	SPR	Smith *et al.* (2003)
verre	*Fonctionnalisation du support*	*AFM*	Shin *et al.* (2003)
	Interactions biotine/streptavidine	Fluorescence	
verre	Interactions biotine/streptavidine (streptavidine marquée avec de l'or)	MEB	Levit-Binnun *et al.* (2003)
or	*Immobilisation des sondes (anticorps et fragments Fab')* et interactions anticorps/antigène	SPR	Peluso *et al.* (2003)
or	Interactions substrat peptidique/enzyme	SPR et fluorescence	Houseman *et al.* (2002)
quartz ou verre	*Fonctionnalisation du support*	*AFM*	Gering *et al.* (2002)
	Interactions anticorps/antigène	Détection chromogénique	
verre	Interactions peptide/anticorps	Fluorescence	Melnyk *et al.* (2002)
verre	Interactions anticorps/antigène	Microscopie TIRF	Akkoyun & Bilitewski (2002)
verre	Interactions peptide/protéine	Marquage radioactif	Falsey *et al.* (2001)
	Adhésion des cellules sur les peptides sondes	Détection chromogénique	
silicium	*Fixation des sondes (fragments Fab' d'anticorps)*	*QCM*	Vikholm & Albers (1998)
	Interactions anticorps/antigène	Marquage radioactif	

Tableau 2 Méthodes analytiques utilisées dans la littérature pour la détection des interactions sonde/cible et la caractérisation des supports

Les techniques d'analyse les plus fréquemment utilisées pour la détection des interactions sonde/cible sont les techniques fluorimétriques et la SPR.

A.V. Objectifs et organisation de la thèse

Nous nous proposons de réaliser un biocapteur constitué par un support plan en verre sur lequel pourront être immobilisées des sondes telles que des protéines, des anticorps ou des carbohydrates.

Plus précisément, le type de support choisi correspond à des lames de verre silanisées par un amino-silane : pour des raisons pratiques, nous avons utilisé des supports commerciaux.

Nous avons choisi d'immobiliser les sondes sur les supports via une liaison covalente stable, par l'intermédiaire d'un bras espaceur, et ce, de façon localisée.

Nous avons utilisé des traceurs fluorescents comme modèles pour contrôler les différentes étapes entrant dans la préparation du support. Nous avons alors employé des techniques fluorimétriques pour l'analyse des greffages sur la surface (spectroscopie et microscopie à fluorescence).

Nous avons dans un premier temps vérifié qu'il était possible de réaliser des greffages covalents sur ces supports (partie B), après quoi, nous avons développé une méthode de localisation basée sur la fabrication de motifs polymères (partie C) que nous avons ensuite testée avec des traceurs fluorescents (partie D). Nous avons enfin fonctionnalisé les supports avec un bras espaceur, pour empêcher les phénomènes d'adsorption non spécifique à la surface et augmenter l'accessibilité des groupements fonctionnels : ce bras est terminé par une fonction aminooxy ou hydrazide permettant le greffage par une liaison covalente stable de molécules biologiques possédant une fonction aldéhyde (partie E).

2ème partie : Partie B

B. GREFFAGES COVALENTS SUR SUPPORTS PLANS

Introduction

La fixation de molécules biologiques sur des supports sous-tend plusieurs étapes de modifications et synthèses chimiques, lesquelles sont réalisées selon différentes conditions opératoires (solvant, température, pH, etc.) et induisent des étapes de lavage tout aussi variées. L'utilisation même du biocapteur implique que l'on suive un protocole bien précis et son éventuelle réutilisation impose de nouveaux traitements chimiques et lavages. Il convient donc de créer entre les molécules et le support des liaisons chimiques fortes et stables. Contrairement aux méthodes basées sur l'adsorption, le greffage covalent semble donc tout particulièrement approprié pour la réalisation des biocapteurs.

Nous allons dans cette partie étudier le greffage covalent sur support. Nous avons choisi d'utiliser des lames de verre fonctionnalisées avec un amino-silane et pour des raisons pratiques, nous avons opté pour des supports commerciaux. Pour étudier les possibilités de greffages covalents sur ces lames, nous avons utilisé des molécules simples tels que des traceurs fluorescents. Les greffages pourront ainsi être détectés par des techniques basées sur la fluorescence telles que la spectrofluorimétrie ; il a fallu auparavant déterminer les caractéristiques spectroscopiques des supports utilisés et nous avons tenté d'estimer leur recouvrement surfacique en groupements amino.

B.I. Choix du support

Les supports sont des surfaces planes permettant la fixation par adsorption ou par greffage covalent de molécules biologiques.

B.I.1. Choix du support : les lames de verre silanisées

Du fait des nombreux avantages que présente le matériau, nous avons choisi d'utiliser des supports en verre. Le point délicat à maîtriser réside dans leur fonctionnalisation monocouche afin de pouvoir y greffer des composés organiques dans des conditions reproductibles.
Des études antérieures réalisées au laboratoire [Mahieuxe, 1995 ; Darne, 1996] ont mis en évidence les différents paramètres permettant d'aboutir à la silanisation homogène de supports en verre ou en silice. Nous décrirons le cas de la fonction amine qui est souvent retenue pour réaliser des greffages covalents sur un support.

B.I.1.1. Silanisation du support

Cette étape va permettre la formation d'une liaison covalente entre le support en verre et divers composés organiques. Elle fait intervenir un bras espaceur, généralement une chaîne alkyle séparant deux parties distinctes : une extrémité siloxane qui va réagir avec les silanols présents sur la surface, l'autre extrémité comportant une fonction organique (acide carboxylique, époxy, amino, etc.). Ce type de fonctionnalisation du support, qui doit aboutir dans notre étude à un recouvrement en fonctions amino, se décompose en deux étapes, qui sont l'hydroxylation et la silanisation.

- *L'hydroxylation :*

L'hydroxylation correspond à une activation de la silice par réaction avec un acide, qui conduit à la création de groupements silanols en surface. Cette étape nécessite un acide fort : les conditions mises au point au laboratoire font intervenir l'acide nitrique 1,5 N, à 50 °C

pendant 1 h. Les plaques sont ensuite abondamment rincées à l'eau et à l'acétone, puis mises à sécher une nuit dans une étuve à 100 °C.

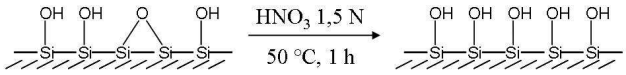


Figure 9 Schéma réactionnel de l'hydroxylation

- *<u>La silanisation</u> :*

La silanisation correspond à la fixation covalente d'un silane sur le support. On choisit le plus souvent le 3-aminopropyltriéthoxysilane qui réagit avec les fonctions hydroxyle des groupements silanol pour former une liaison siloxane, laissant ainsi les fonctions amine libres éloignées de la surface par un court bras espaceur de type propyle.

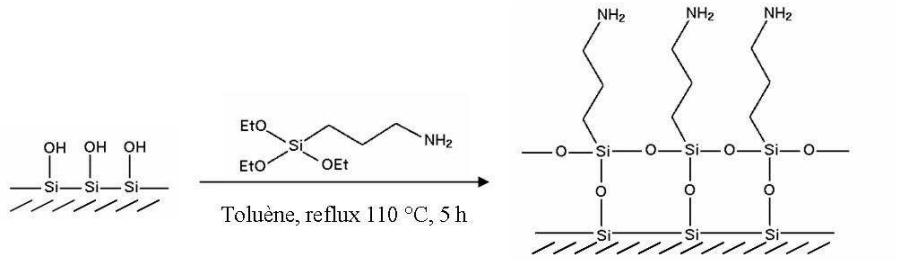


Figure 10 Schéma réactionnel de la silanisation par le 3-aminopropyltriéthoxysilane

La silanisation est réalisée dans le toluène anhydre, à 110 °C à reflux, pendant 5 h. Les supports sont ensuite rincés avec du toluène et de l'acétone, puis sont séchés plusieurs heures dans une étuve à 100 °C.

Afin d'obtenir en surface un recouvrement monocouche en groupements amino, la silanisation doit être réalisée en milieu strictement anhydre. En effet, la présence d'eau dans le solvant conduit au développement aléatoire de chaînes polysiloxanes.

B.I.1.2. Les supports commerciaux

Bien qu'il soit possible de préparer des lames silanisées au laboratoire, nous avons préféré utiliser des supports commerciaux. En effet, l'étude des greffages covalents et de la polymérisation sur support ayant nécessité l'utilisation d'un nombre important de plaques, il s'est avéré plus pratique d'avoir recours à des supports commerciaux.

Les lames étudiées sont silanisées -NH_2 en surface : il s'agit des lames "Silane-Prep Slides" (SIGMA Diagnostics, réf. S4651), notées "lames S" dans toute la suite.

B.II. Les techniques et systèmes d'analyse utilisés

Nous avons dans un premier temps étudié des traceurs fluorescents comme modèles pour valider les greffages covalents sur les lames silanisées. Rappelons que ce travail a pour objet la préparation des supports en vue de réaliser le greffage covalent et localisé d'anticorps. Le greffage de molécules fluorescentes doit également permettre de valider la méthode de localisation qui sera présentée dans la prochaine partie.
Nous avons alors tout naturellement choisi d'utiliser les techniques d'analyse basées sur les propriétés de fluorescence des molécules, telles que la spectrofluorimétrie et la microscopie à fluorescence, pour analyser les résultats de ces greffages.
Par ailleurs, nous verrons qu'il est nécessaire de connaître au préalable les caractéristiques en absorption UV-visible des composés en solution.

B.II.1. La spectroscopie d'absorption UV-visible

La spectrophotométrie est fondée sur l'étude de l'absorption de la lumière UV-visible par un constituant d'un milieu. La densité optique (DO) ou absorbance (A) d'une solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour les solutions diluées, la loi de Beer-Lambert établit une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration (des espèces absorbantes) :

$$DO = A = \varepsilon c l$$

Avec :

ε : coefficient d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

c : concentration de la solution ($mol.L^{-1}$)

l : longueur de la cuve contenant la solution à analyser (cm)

L'appareil que nous avons utilisé est un spectrophotomètre ***Lambda EZ210 PerkinElmer*** dont le principe de fonctionnement est décrit en annexe (Annexe 1).
Le tracé des spectres peut se faire soit en absorbance, soit en transmission.

B.II.2. La spectroscopie de fluorescence

Lorsqu'une molécule après avoir absorbé un photon se trouve dans un état excité, elle peut revenir à l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence. Ce photon possède une énergie $h\nu_{ém}$ inférieure à l'énergie du photon absorbé $h\nu_{ex}$, et comme $\nu = c/\lambda$, l'émission de fluorescence se fera à une longueur d'onde $\lambda_{ém}$ supérieure à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}. La différence entre ces deux valeurs ($\lambda_{ém}$-λ_{exc}) est appelée déplacement de Stokes.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence traduisent la distribution des probabilités des transitions énergétiques. Ils sont globalement symétriques par rapport à une transition (effet miroir).

L'émission de fluorescence est soumise à l'influence de divers paramètres du milieu : concentration, température, polarité du solvant, pH, présence d'autres molécules, etc.

Mesure des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence :

L'appareil que nous avons utilisé est un ***Spex FluoroLog-3*** de chez ***HORIBA Jobin Yvon***. Son principe de fonctionnement est décrit en annexe (Annexe 1).

Pour mesurer un spectre d'émission, on fixe la longueur d'onde d'excitation, et on définit la plage d'observation de l'émission de fluorescence. Pour connaître la longueur d'onde d'excitation optimale, c'est-à-dire telle que la réponse en émission soit la plus intense, on commence par réaliser un spectre d'absorption du composé fluorescent en solution. En effet, si les expériences sont réalisées dans le même solvant, les spectres d'absorption et d'excitation sont semblables, à une correction près. Dans notre cas, nous avons essentiellement mesuré la fluorescence de molécules greffées sur des supports. Les résultats sont alors différents de ceux que l'on peut obtenir en solution. Les analyses réalisées avec le spectrophotomètre à partir des composés en solution deviennent dans ce cas purement indicatives.
Pour le tracé des spectres d'excitation, on fixe la longueur d'onde d'émission et on fait varier la longueur d'onde d'excitation dans une plage bien définie.

Un spectre de type S (Sample) correspond au signal brut reçu par le détecteur (photomultiplicateur). Un spectre de type R (Reference) correspond au signal de référence (lumière incidente émise par la lampe). Pour s'affranchir des variations avec la longueur d'onde de l'efficacité de certains éléments de l'appareil (monochromateurs et photomultiplicateur) ainsi que des variations d'intensité de la lampe au cours du temps, à l'acquisition les spectres sont automatiquement corrigés, d'une part grâce à des fichiers de correction stockés dans l'ordinateur associé au spectrofluorimètre (Sc et Rc), et d'autre part ils sont normés par rapport à la lumière excitatrice (Sc/Rc).

Les spectres ont été réalisés avec une résolution spectrale (notée *f*) égale à 3 nm et le temps d'intégration a été fixé à 0,5 secondes (pour 1 nm). L'intensité est exprimée en coups par seconde corrigés par rapport au signal de référence (cps).

Pour les mesures de fluorescence sur support, les plaques sont disposées en position frontale ("front face"), c'est-à-dire de telle sorte que le faisceau réémis forme un angle de 45 ° avec la plaque.

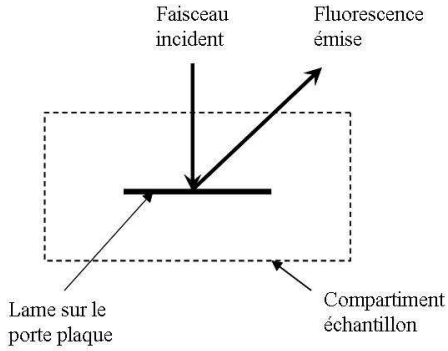


Figure 11 Analyse au spectrofluorimètre de la fluorescence des plaques
Positionnement frontal ("front face") – vue de dessus du compartiment échantillon

B.III. Caractérisation des supports commerciaux

Préalablement à la réalisation des greffages sur les supports (greffage de fluorophores, fixation d'un bras espaceur, etc.), il est important de connaître le recouvrement surfacique en groupements amino des plaques (densité et homogénéité du recouvrement), mais aussi leur éventuelle auto fluorescence qui pourrait alors gêner la détection des greffages. Par ailleurs, il est nécessaire de connaître les propriétés de surface de ces supports, la fabrication des motifs polymères étant réalisée à même les lames après étalement d'une résine photosensible liquide.

B.III.1. Description des lames S

Les lames S ont pour dimensions 75 mm × 25 mm × 1 mm (longueur × largeur × épaisseur). Elles sont silanisées -NH_2 sur les deux faces mais une partie de la surface (18 mm × 25 mm) est volontairement rendue inactive par le fabriquant ("frosted end" ou verre dépoli) pour permettre l'identification des lames. Nous ne possédons pour ces supports aucune information relative à la densité surfacique en fonctions amine.

Propriétés de surface:

La mesure d'angle de contact permet de rendre compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. On mesure (généralement avec un goniomètre) l'angle à l'interface liquide/solide formé par une goutte d'eau déposée sur un support. On en déduit le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface.

Le greffage d'un silane tel que l'APTS sur des supports en verre a pour conséquence l'augmentation du caractère hydrophobe de la surface, du fait de la présence de la chaîne carbonée propyle [Diao *et al.*, 2005 ; Wang & Jin, 2004]. Diao *et al.* (2005) ont pu vérifier par la mesure des angles de contact, que des supports en nitrure de silicium silanisés avec l'APTS présentaient en effet un caractère hydrophobe.

Cette propriété est très importante car les polymérisations vont être réalisées à même les supports après étalement d'une résine liquide hydrophobe (cf. partie C). Nous avons en effet pu constater que les dépôts de solutions aqueuses ne s'étalaient pas sur la surface des lames S, mais que les gouttes restaient bien formées ; *à contrario*, la résine photosensible utilisée (fonctions époxy) s'étalait correctement sur ces mêmes lames, ce qui permet de conclure positivement quant à leur caractère hydrophobe.

B.III.2. Caractéristiques spectroscopiques

Les lames S ont été analysées avec le FluoroLog 3 : les spectres d'émission et d'excitation présentés ci-après sont corrigés et normés (Sc/Rc) et les mesures ont été réalisées en plusieurs points le long de la plaque (8 mesures) avec une résolution spectrale égale à 3 nm.

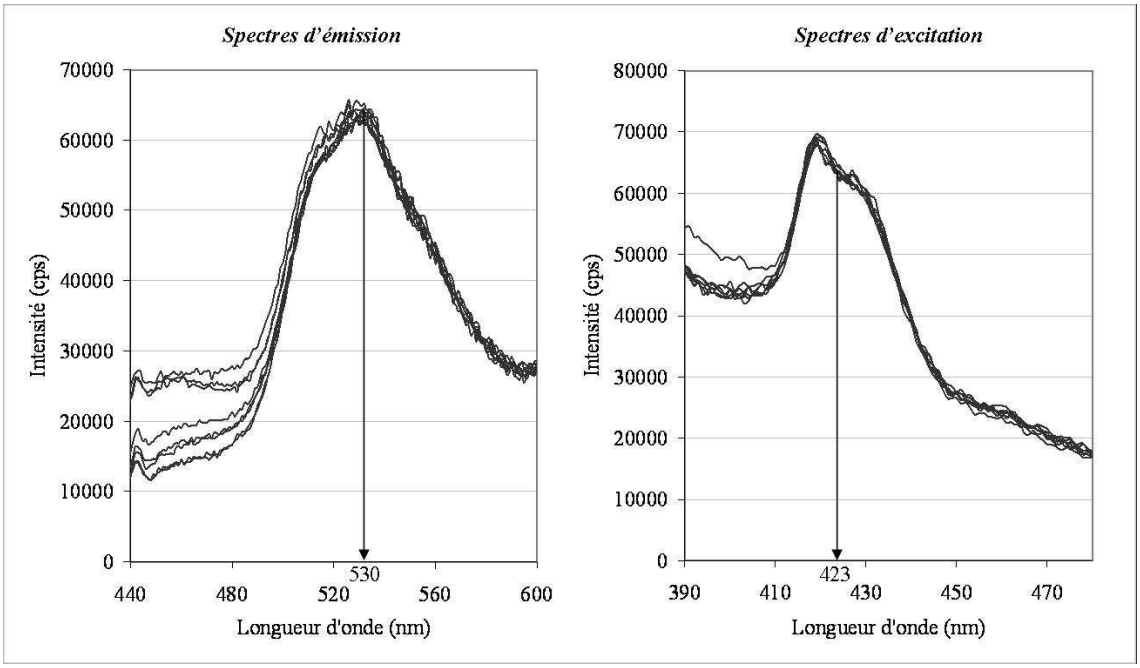


Figure 12 Analyse de la fluorescence des lames S
Spectres d'émission (λ_{exc} = 423 nm) et d'excitation ($\lambda_{ém}$ = 530 nm), mode Sc/Rc, f = 3 nm

Les lames S présentent une fluorescence intrinsèque non négligeable qu'il conviendra de prendre en considération lors de l'analyse au spectrofluorimètre des greffages sur ces supports. Les maxima à l'excitation et à l'émission sont observés à 423 et 530 nm respectivement. Les spectres d'émission ont été tracés entre 440 et 600 nm pour une

excitation à 423 nm (λ_{exc}), et les spectres d'excitation entre 390 et 480 nm pour une émission à 530 nm ($\lambda_{ém}$).

On remarque que le signal à l'émission, comme à l'excitation, est homogène sur toute la longueur de la plaque.

B.III.3. Dosage des groupements amino surfaciques

Afin de pouvoir quantifier les greffages qui vont être réalisés sur les supports, nous avons tenté de déterminer leur recouvrement surfacique en groupements amino. Deux méthodes de dosage ont été testées afin de déterminer la densité surfacique en fonctions amine libres des lames S. Il s'agit de méthodes spectroscopiques : l'une est basée sur l'absorption UV-visible et l'autre sur la fluorescence.

B.III.3.1. Méthode de dosage par le *p*-nitrobenzaldéhyde

Cette méthode, décrite par Moon *et al.* (1996) repose sur l'absorption UV-visible du *p*-nitrobenzaldéhyde. Elle consiste à greffer par une liaison imine ce composé sur les lames silanisées -NH_2, puis à le libérer en solution par hydrolyse de la liaison imine en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.). Le *p*-nitrobenzaldéhyde est alors dosé dans l'hydrolysat par spectrophotométrie.

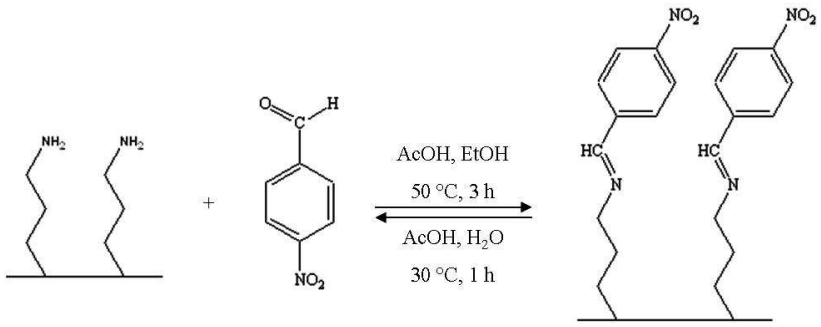


Figure 13 Schéma réactionnel du dosage des fonctions amine des lames S par le *p*-nitrobenzaldéhyde

Nous avons procédé à l'étalonnage de ce composé en milieu acide acétique dilué (cf. Annexe 2). Plusieurs expériences de dosage ont ensuite été réalisées ; les spectres d'absorption des hydrolysats ont été mesurés dans des cuves en quartz. Les quantités à doser se sont avérées être trop faibles et bien en deçà de la limite de détection de l'appareil. Nous nous sommes

alors dirigés vers une méthode de dosage des amines utilisant un dérivé de coumarine fluorescent synthétisé au laboratoire.

B.III.3.2. Méthode de dosage par la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine

La spectrofluorimétrie étant une technique d'analyse plus sensible que la spectrophotométrie, nous avons opté pour une méthode de dosage basée sur la fluorescence. Nous avons alors transposé la méthode décrite par Moon *et al.* (1996) à un composé fluorescent. Le choix s'est porté sur un dérivé coumarine déjà étudié au laboratoire [Geoffroy-Chapotot, 1998] : il s'agit de la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine notée dans la suite CouCHO:

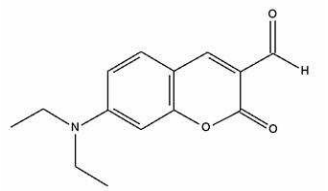


Figure 14 Structure de la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (CouCHO)

B.III.3.2.a Principe de la méthode

La méthode utilisant le dérivé coumarine CouCHO est identique à celle utilisant le p-nitrobenzaldéhyde, à la différence que l'hydrolysat est cette fois-ci dosé par spectrofluorimétrie.

Le composé CouCHO est greffé par une liaison imine sur les plaques silanisées -NH_2 puis on procède à l'hydrolyse en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.). Le dérivé coumarinique libéré en solution est alors dosé par spectroscopie de fluorescence. Les étapes de greffage et d'hydrolyse sont par ailleurs contrôlées par analyse des plaques au spectrofluorimètre.

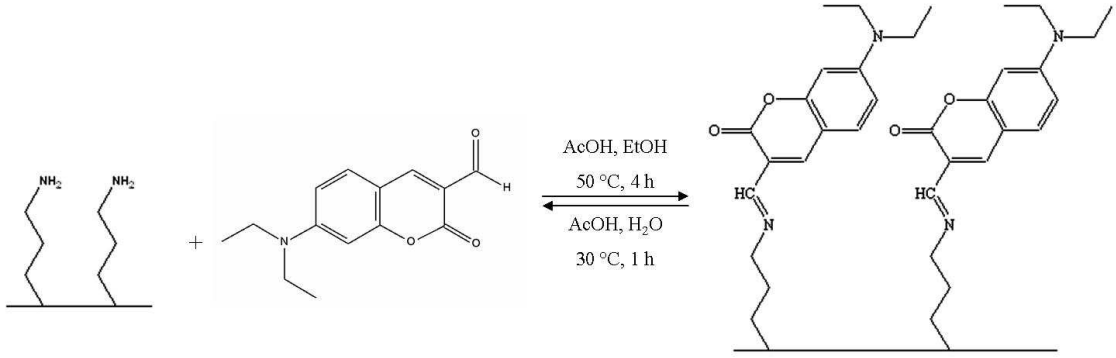


Figure 15 Schéma réactionnel du dosage des fonctions amine par la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (CouCHO)

B.III.3.2.b Etalonnage de CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué

Pour pouvoir doser CouCHO dans l'hydrolysat, nous avons réalisé un étalonnage par fluorescence de ce composé en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.), ses propriétés photophysiques ayant au préalable été déterminées. Le spectre d'absorption de CouCHO présente un maximum à 445 nm ; le pic situé à 264 nm correspond au solvant (acide acétique/eau, 0,16 % vol.) (Figure 16).

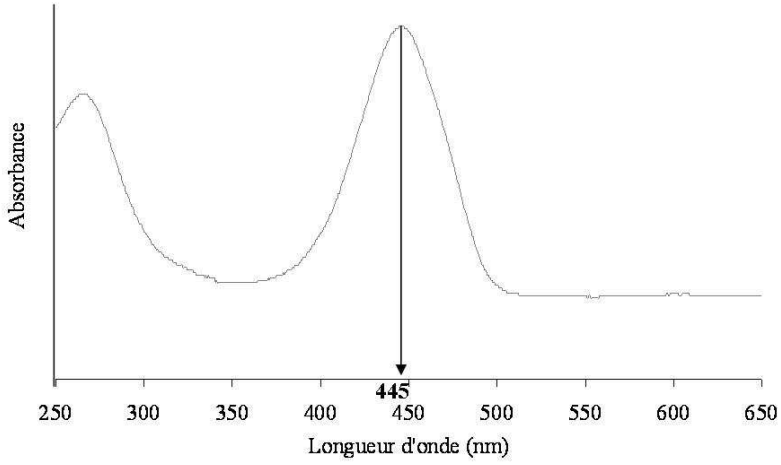


Figure 16 Spectre d'absorption de CouCHO en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.)

Ce composé a ensuite été analysé au spectrofluorimètre (Figure 17). Les mesures ont été réalisées avec une résolution spectrale égale à 3 nm. Les maxima en excitation et en émission de fluorescence sont observés respectivement à 453 nm (λ_{exc}) et à 500 nm ($\lambda_{ém}$).

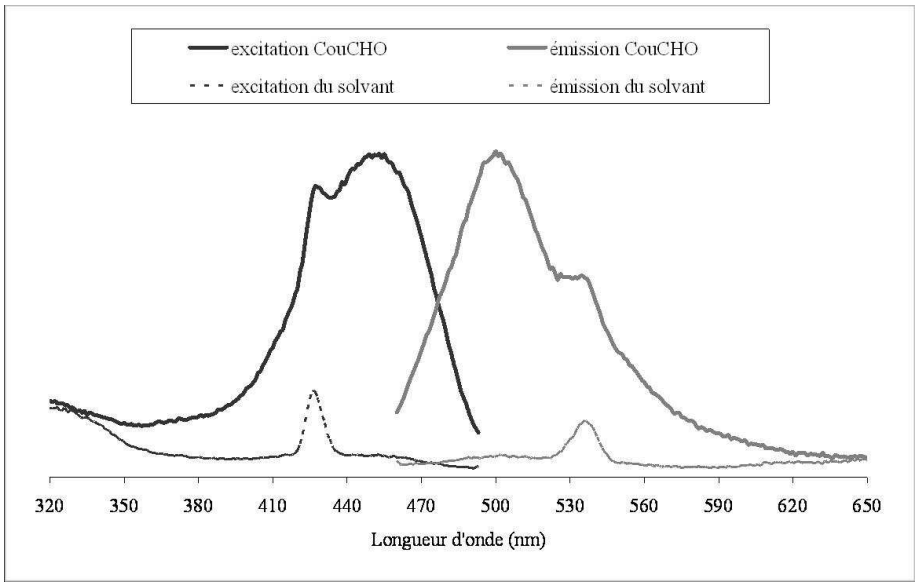


Figure 17 Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.)

Nous avons vérifié que les épaulements observés respectivement à 427 nm et à 536 nm sur les spectres d'excitation et d'émission étaient bien dus au solvant. Sur les figures 16 et 17, nous pouvons constater un écart de 8 nm entre les maxima d'absorption (λ_{abs}) et d'excitation (λ_{exc}). Cette différence observée au cours de différents essais a été attribuée à un mauvais calibrage du spectrophotomètre.

D'après l'étalonnage qui a été réalisé (cf. Annexe 3 et Figure 18), les intensités mesurées au maximum d'émission (à 500 nm) varient linéairement avec la concentration au-dessus d'une valeur limite estimée à 2.10^{-8} mol.L^{-1}.

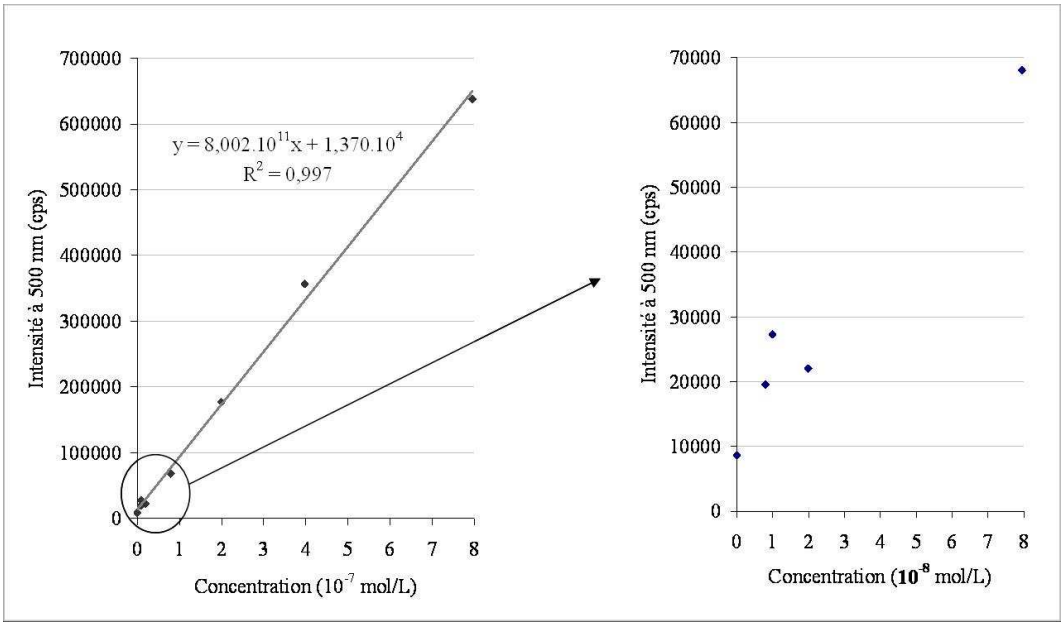


Figure 18 Etalonnage de CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.) Intensité (500 nm) vs Concentration – à droite : zoom entre 0 et 8.10^{-8} mol/L

Plusieurs expériences de dosage des fonctions amine présentes à la surface des lames S ont ensuite été réalisées.

B.III.3.2.c Résultats du dosage des fonctions amine des lames S par CouCHO

Les plaques pour lesquelles les dosages ont été entrepris ont été analysées en fluorescence après les étapes de greffage et d'hydrolyse des imines.

B.III.3.2.c.1- *Analyse des lames S greffées avec CouCHO*

Les spectres de fluorescence ont été réalisés en huit points pris à intervalles réguliers sur toute la longueur de la plaque. Ils sont représentés sur la figure 19.

Remarque: Nous ne présentons pas les spectres d'excitation qui traduisent le même phénomène.

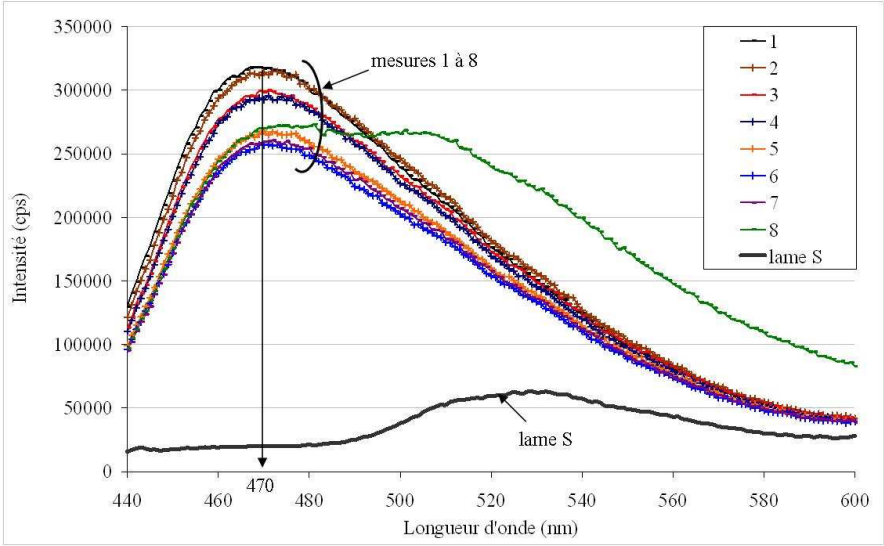


Figure 19 Spectres d'émission de fluorescence d'une lame S greffée avec CouCHO
λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm

Le composé CouCHO greffé par une liaison imine sur le support silanisé présente un maximum d'émission de fluorescence à **470 nm** pour une excitation à **423 nm**. Ces caractéristiques sont différentes de celles en solution ($\lambda_{ém}$ = 500 nm) : ceci est dû au fait que la molécule greffée a moins de possibilités de se désactiver par rotations, vibrations et changements conformationnels. Rappelons par ailleurs que l'étalonnage de CouCHO en solution a été réalisé en milieu acide acétique dilué, soit dans un solvant polaire dans lequel le composé activé est stabilisé. Il est donc probable que les niveaux excités des molécules soient plus énergétiques lorsqu'elles sont greffées, induisant ainsi une fluorescence à une longueur d'onde plus faible.

On remarque par ailleurs que le greffage n'est pas très homogène sur toute la longueur de la plaque : on observe un écart de 20 % entre les deux valeurs extrêmes (écart calculé au maximum d'intensité). Cet écart peut être attribué à une réaction incomplète et/ou à une mauvaise silanisation du support commercial.

Le spectre observé au point 8 peut être expliqué par la présence d'impuretés sur la lame à cet endroit.

Les différentes caractéristiques spectrales pour CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué ou greffé sur une lame S sont rappelées dans le tableau ci-dessous:

	λ_{exc} (nm)	$\lambda_{ém}$ (nm)
CouCHO en solution dans AcOH/H_2O, 0,16 % vol.	453	500
CouCHO greffé sur lame S	≈ 423	470

Tableau 3 Maxima en excitation et en émission de fluorescence pour CouCHO: 1) en solution dans l'acide acétique dilué, 2) greffé sur une lame S

B.III.3.2.c.2- *Analyse des lames après hydrolyse acide des imines*

Les spectres de fluorescence des lames après hydrolyse acide des imines ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment.

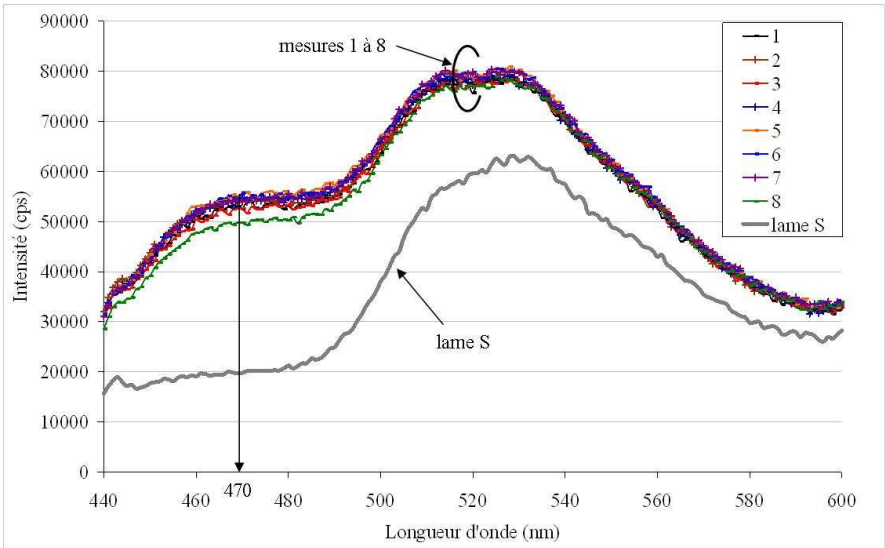


Figure 20 Spectres d'émission d'une lame S greffée avec CouCHO après hydrolyse des imines $\underline{\lambda_{exc} = 423\ nm}$, mode Sc/Rc, f = 3 nm

Sur les spectres d'émission de la figure 20, on retrouve à 470 nm le signal caractéristique de CouCHO greffé sur une lame S : l'hydrolyse n'est donc pas totale. Sachant qu'il faudra en tenir compte pour la détermination du recouvrement surfacique en fonctions amine des supports, nous avons calculé le taux d'hydrolyse moyen en appliquant la relation suivante :

$$\tau\,(\%) = \frac{signal\ \ plaque\ \ greffée - signal\ \ plaque\ \ hydrolysée}{signal\ \ plaque\ \ greffée - signal\ \ plaque\ \ S} \times 100$$

Les maxima en intensité à l'émission pour les différentes mesures réalisées sur la plaque S greffée avec CouCHO puis hydrolysée ainsi que les taux moyens d'hydrolyse, sont regroupés dans le tableau 4 :

	Spectres d'émission	
	Intensité à 470 nm (cps)	
Mesure	Plaque greffée	Plaque hydrolysée
1	317 091	52 547
2	313 893	53 998
3	298 631	52 629
4	292 544	49 822
5	267 577	55 815
6	256 820	55 681
7	259 658	54 218
8	270 072	54 737
Moyenne	**284 536**	**53 681**
Lame S	*19 770*	
τ (%)	***87***	

Tableau 4 Maxima à l'émission (470 nm) pour la plaque S greffée avec CouCHO puis hydrolysée - Taux d'hydrolyse moyens

Le taux d'hydrolyse moyen calculé est égal à 87 %. Cette correction sera prise en compte dans le calcul de la densité surfacique en fonctions amine des lames S.

B.III.3.2.c.3- *Analyse de l'hydrolysat*

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'hydrolysat ont été réalisés pour deux prises d'échantillon (mesures 1 et 2 sur la figure 21).

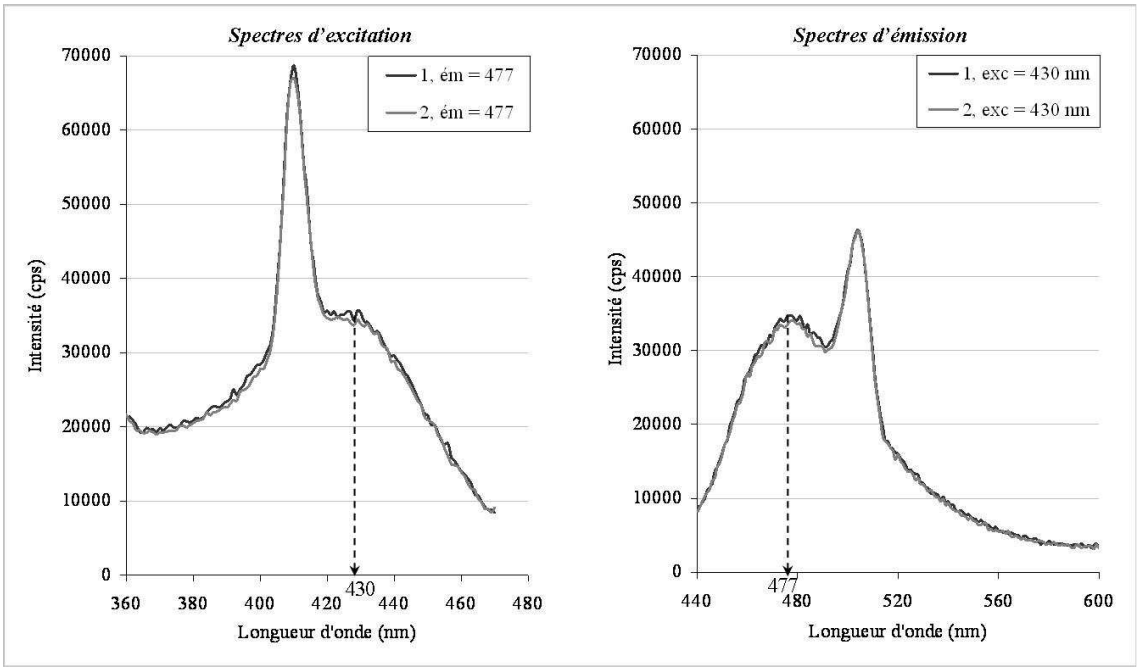


Figure 21 Spectres d'excitation ($\lambda_{ém}$ = 477 nm) et d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 430 nm) de l'hydrolysat, mode Sc/Rc, f = 3 nm

Si on se reporte aux mesures qui ont été faites pour l'étalonnage (cf. B.III.3.2.b), il apparaît que CouCHO dans l'acide acétique dilué présente un maximum de fluorescence à 500 nm pour une excitation à 453 nm. Les analyses réalisées en fluorescence ont montré que les maxima obtenus pour l'hydrolysat ne correspondaient pas aux valeurs attendues : en effet le maximum se situe vers 477 nm à l'émission et vers 430 nm à l'excitation. Nous avons systématiquement observé ce décalage à l'issue des nombreuses expériences de dosage, ce qui semble suggérer que le composé libéré en solution n'est pas exactement CouCHO.

Nous avons alors reproduit la même expérience en solution : nous avons fait réagir CouCHO avec une amine, en l'occurrence l'hexylamine, en procédant exactement de la même manière que sur les supports, puis nous avons hydrolysé l'imine formée dans l'acide acétique dilué. Les résultats obtenus dans ce cas sont cohérents : nous avons vérifié par analyse RMN et au spectrofluorimètre qu'on formait bien l'imine et que le produit résultant de l'hydrolyse correspondait bien à CouCHO. Cette expérience nous a par ailleurs permis de constater que le composé imine obtenu à partir de CouCHO et d'hexylamine présente les mêmes caractéristiques spectrales que CouCHO en terme de longueur d'onde mais qu'il est davantage fluorescent.

Bien que nous ne puissions pas expliquer le décalage observé dans le cas de l'hydrolysat, le composé libéré en solution doit être assez proche de CouCHO dans sa structure. Nous avons alors estimé sa concentration à partir des valeurs des maxima d'excitation (430 nm) et d'émission (477 nm) observés, et d'après l'étalonnage réalisé avec CouCHO.

Pour déterminer le recouvrement surfacique en fonctions amine des supports, il faut tenir compte de plusieurs paramètres :

- le taux d'hydrolyse effectif (87 %),
- le volume de l'hydrolysat (50 mL),
- la surface des lames S qui est fonctionnalisée (28,5 cm^2),
- le taux de greffage sur les supports compte tenu de l'encombrement de CouCHO qui a été estimé à partir des travaux réalisés antérieurement au DCPR-GRAPP (10 à 13 %) [Mahieuxe, 1995; Darne, 1996].

A partir de ces valeurs, on calcule une densité surfacique en fonctions amines sur les lames S égale à $4{,}6.10^{-10}$ mol/cm^2, valeur qui reste purement indicative puisqu'il subsiste des incertitudes sur la nature du composé dosé dans l'hydrolysat. L'ordre de grandeur semble cependant correct ; en effet, nous disposons au laboratoire d'autres lames commerciales silanisées (NH_3^+,Cl^-) en surface (ArrayIt^{TM} DNA Microarray Products, SuperAmine Substrates, réf. SMM-25): les données rapportées par le fabriquant font mention d'un recouvrement surfacique en groupements amino égal à $8{,}3.10^{-10}$ mol/cm^2. Cette valeur est à rapprocher de celle annoncée dans la littérature par Moon et *al*. (1996) (4.10^{-10} mol/cm^2).

B.IV. Greffage covalent de traceurs fluorescents sur les lames commerciales

Depuis plusieurs années le DCPR-GRAPP développe des rotors moléculaires fluorescents. Ces sondes fluorescentes se sont révélées efficaces comme sondes de polarité et de viscosité pour l'étude de polymères amphiphiles [Adibnejad, 1996 ; Benjelloun *et al*., 1997]. Par ailleurs, ces fluorophores présentant dans leur structure une fonction acide carboxylique, ils se prêtent bien à des modifications : greffés à des cycles fortement hydrophiles (glucosamine, inositol), leur localisation dans des cellules a été étudiée par microscopie de fluorescence [Geoffroy-Chapotot *et al*., 2000] ; des polymères bioactifs de type polysaccharide (dérivés du dextrane, héparine) ont été marqués par des rotors moléculaires fluorescents pour visualiser par microscopie de fluorescence leur internalisation dans des cellules (endothéliales et musculaires lisses) [Even *et al.*, 2003]. Ils ont également été utilisés dans la préparation de groupements photolabiles fluorescents pour le marquage et la protection de nucléosides [Muller *et al.*, 2001]. Partant de ces quelques exemples, nous avons choisi pour la réalisation des greffages covalents sur les lames silanisées, deux composés émettant à des longueurs d'onde distinctes : un dérivé cinnamilydène et un dérivé coumarine.

B.IV.1. Cas du rotor fluorescent acide CiCOOH

Le premier fluorophore choisi est un dérivé cinnamilydène connu synthétisé par Muller (2001) selon un protocole mis au point au laboratoire : il s'agit de l'acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque noté CiCOOH. Il a été obtenu par condensation de Knoevenagel entre le diméthylamino-cinnamaldéhyde et l'acide cyanoacétique en solution dans le méthanol, en présence d'oxyde de magnésium.

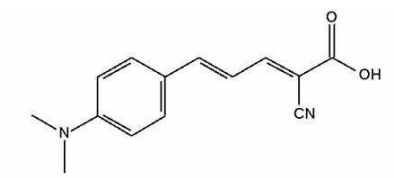


Figure 22 Structure de l'acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque (CiCOOH)

Afin d'en faciliter le greffage sur les lames silanisées, nous avons procédé à l'activation de la fonction acide par le N-hydroxysuccinimide (NHS), en suivant les conditions de greffage sur supports décrites dans la littérature avec d'autres composés acides [MacBeath *et al.*, 1999].

B.IV.1.1. Activation de la fonction acide du traceur CiCOOH par le NHS

L'activation de la fonction acide du composé CiCOOH par le NHS conduit à l'ester de succinimidyle de l'acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque, noté dans toute la suite CiNHS (Rdt : 48 %) ; la réaction est réalisée en présence d'EDAC.HCl dans le dichlorométhane (Figure 23).

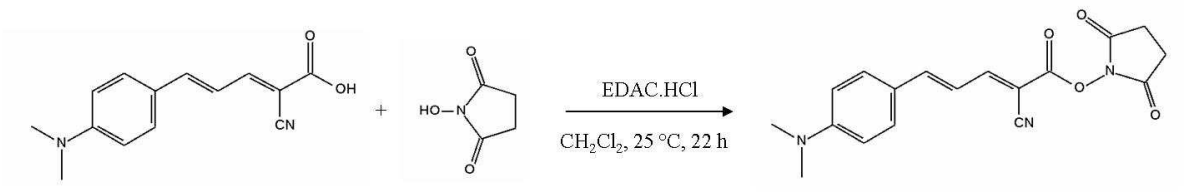


Figure 23 Synthèse de l'ester de succinimidyle de l'acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque (CiNHS)

B.IV.1.2. Greffage du composé CiNHS sur les lames S

Le rotor fluorescent activé CiNHS est greffé sur les lames S par une liaison amide. La réaction est conduite dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à pH 8,5. Après 4 h de greffage, sous légère agitation magnétique, à température ambiante et à l'abri de la lumière, les plaques sont soigneusement rincées plusieurs heures par immersion dans différents solvants. Elles sont ensuite séchées puis analysées au spectrofluorimètre.

B.IV.1.3. Analyse du greffage

La fluorescence a été mesurée en six points sur toute la longueur d'une demi-plaque S greffée ; les spectres d'émission sont présentés sur la figure 24.

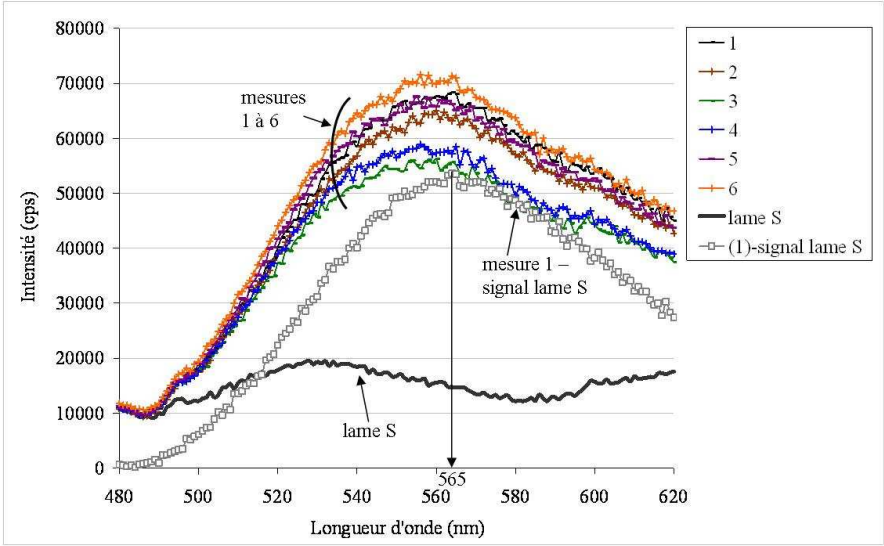


Figure 24 Spectres d'émission de fluorescence d'une lame S greffée avec CiNHS
λ_{exc} = 470 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm

Le signal d'une plaque S excitée à 470 nm a été également reporté sur cette figure. Il a été soustrait au signal brut pour pouvoir visualiser la fluorescence du cinnamilydène greffé (courbe notée "(1) - signal lame S"). Le maximum de fluorescence est ainsi mieux caractérisé: il se situe à **565 nm** pour une excitation à **470 nm**.

On peut remarquer que le greffage n'est pas très homogène sur toute la longueur de la demi-plaque : on observe un écart de 28 % entre les mesures 3 et 6 !

Le rotor fluorescent CiCOOH greffé sur les lames S présente des caractéristiques spectrales très distinctes de celles du support vierge: ce composé sera retenu pour l'étude des greffages localisés.

B.IV.2. Cas du dérivé coumarine CouCOOH

Le deuxième fluorophore étudié est un dérivé coumarine: il s'agit de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique noté CouCOOH. Ce composé, déjà étudié au laboratoire [Geoffroy-Chapotot, 1998], était préparé en deux étapes: condensation de Knoevenagel entre le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde et le malonate de diéthyle en milieu basique pour former le 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylate d'éthyle, suivie d'une hydrolyse acide [Van Gompel & Schuster, 1987]. Nous avons appliqué un protocole en une étape décrit récemment par Song *et al*. (2003): un mélange équimolaire de 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde et d'acide de Meldrum, en présence d'une quantité catalytique d'acétate de pipéridinium dans l'éthanol à reflux, conduit au composé CouCOOH avec un rendement de 75 %. Cette voie de synthèse est très rapide (2 h) et l'acide cristallisé est facilement isolé par filtration et lavage à l'éthanol.

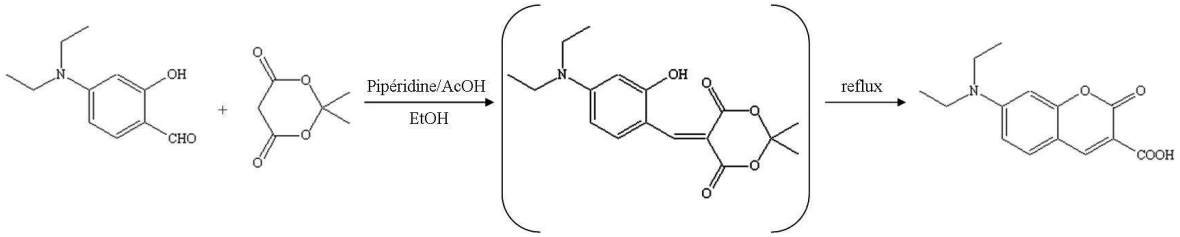


Figure 25 Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique CouCOOH [Song *et al.*, 2003]

B.IV.2.1. Greffage du composé CouCOOH sur les lames S

Pour greffer le composé CouCOOH sur les lames silanisées $-NH_2$ via une liaison amide, nous avons procédé exactement de la même façon qu'avec le rotor CiCOOH : la fonction acide est activée par le NHS (synthèse de l'ester de succinimidyle noté CouNHS) et le greffage est réalisé dans une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5 (Figure 26).

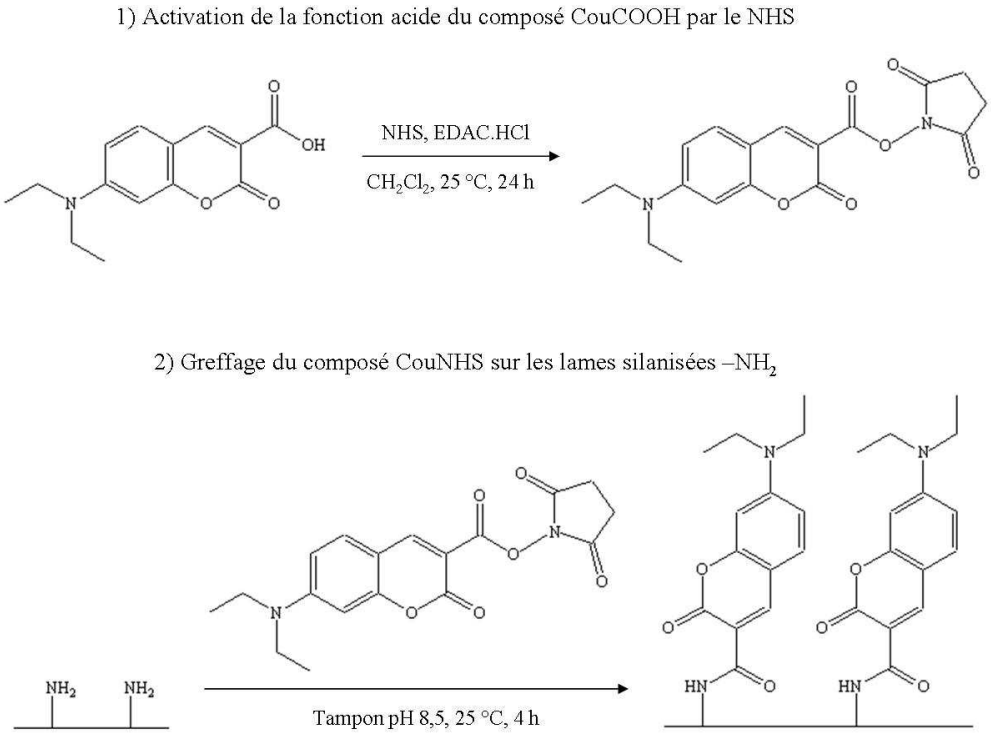


Figure 26 Greffage du composé CouCOOH sur les supports $-NH_2$

B.IV.2.2. Analyse du greffage

La fluorescence a été analysée sur toute la longueur d'une plaque S greffée, en sept points ; les spectres de fluorescence sont présentés ci-après.

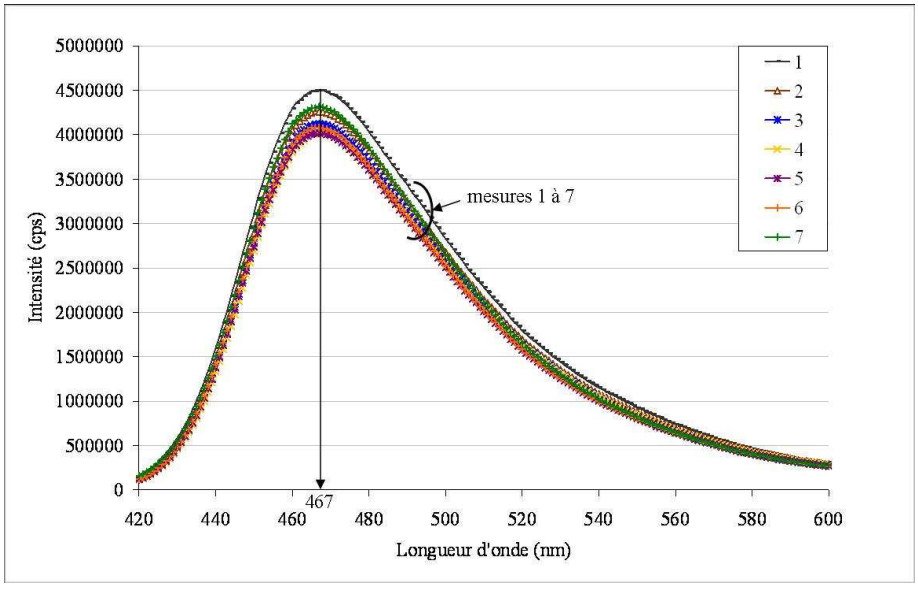


Figure 27 Spectres d'émission de fluorescence d'une lame S greffée avec CouNHS
$\lambda_{exc.}$ = 410 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm

On détecte un signal de fluorescence très intense ; le maximum à l'émission est dans ce cas observé à **467 nm** pour une excitation à **410 nm**. Nous n'avons pas reporté sur cette figure la fluorescence de la plaque S vierge car elle est négligeable par rapport à celle du traceur CouCOOH.
Le signal est cette fois-ci assez homogène puisque l'écart entre deux mesures réalisées sur la plaque atteint au maximum 11 %.

Nous avons pu constater par ailleurs (cf. partie D, § D.I.3.2.), un déplacement du maximum d'émission ($\lambda_{ém}$) vers les courtes longueurs d'onde (déplacement hypsochrome) lorsque la concentration en fluorophore greffé diminue (Figure 28). Le graphe présenté ci-après a été réalisé à partir des valeurs extraites du spectre de la figure 72 présenté dans la partie D.

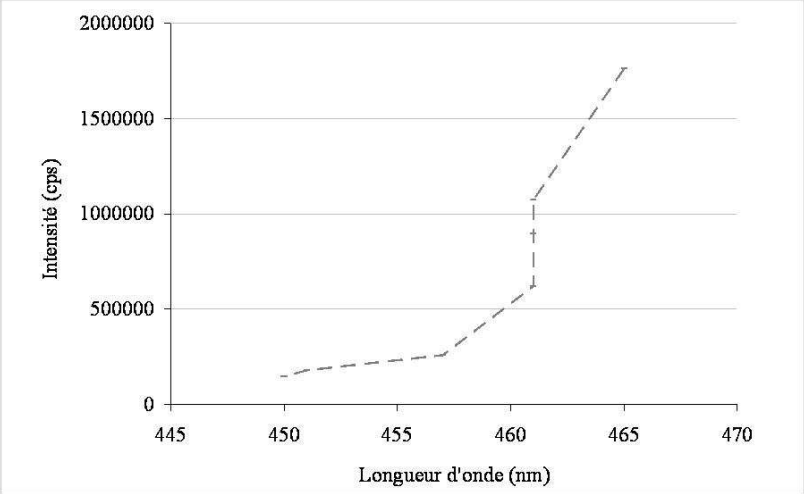


Figure 28 CouNHS greffé sur une lame S : déplacement du maximum à l'émission ($\lambda_{ém}$) en fonction de l'intensité du signal observé (cf. Figure 72, partie D)

Ce phénomène traduit un effet de concentration : il se produit des interactions entre les niveaux vibrationnels des molécules greffées sur la surface, qui sont fonction de leur proximité les unes par rapport aux autres. Ces interactions ont pour effet de modifier les différents états énergétiques des molécules, d'où un déplacement du maximum à l'émission (cf. Annexe 1).

Le composé CouCOOH greffé sur les lames S présente des caractéristiques spectrales distinctes à la fois de celles du support et de celles du rotor CiCOOH ; il est par ailleurs très fluorescent : il va être également retenu pour la réalisation des greffages localisés (partie C).

B.V. Partie expérimentale

B.V.1. Matériels et méthodes

Produits chimiques :

Les spécifications des produits et solvants utilisés sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Produit	Formule brute	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Fournisseur	Référence
Réactifs				
Acide acétique	$C_2H_4O_2$	60,05	Aldrich	10,908-8
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	84,01	Acros Organics	217225000
Chlorhydrate de 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide	$C_8H_{17}N_3.HCl$	191,71	Sigma	E7750
4-Diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde	$C_{11}H_{15}NO_2$	193,25	Aldrich	14625-078
2,2-Diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione	$C_6H_8O_4$	144,13	Aldrich	21,014-5
N-Hydroxysuccinimide	$C_4H_5NO_3$	115,90	Aldrich	13,067-2
p-Nitrobenzaldéhyde	$C_7H_5NO_3$	151,00	Fluka	A56173
Pipéridine	$C_5H_{11}N$	85,15	Aldrich	10,409-4
Sulfate de sodium anhydre	Na_2SO_4	142,04	Acros Organics	196640050
Solvants				
Dichlorométhane	CH_2Cl_2	84,93	Carlo Erba	528372
Diméthylformamide	C_3H_7NO	73,10	Fluka	40250
Diéthyléther	$C_4H_{10}O$	74,12	Sds	0440221
Ethanol absolu	C_2H_6O	46,07	Carlo Erba	528131

Méthodes physico-chimiques :

Le suivi des synthèses est réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques de silice Kieselgel 60 F_{254} (Merck, réf. 1.05554.0001). Cette technique nous a permis d'analyser les constituants des mélanges réactionnels et de contrôler la pureté des produits.

Les bruts réactionnels ont été dans la plupart des cas purifiés par une séparation par chromatographie sur colonne de silice (gel de silice, 70-200 µm, Sds 2100017).

Les points de fusion sont mesurés sur un banc Kofler.

Les spectres RMN ^{1}H ont été réalisés sur un appareil Brüker 300 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en Hz. Nous adopterons la notation suivante pour caractériser les signaux : s, singulet ; d, doublet ; dd, doublet dédoublé ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet.

B.V.2. Dosage des fonctions amine des supports par le p-nitrobenzaldéhyde

B.V.2.1. Formation des imines

Le *p*-nitrobenzaldéhyde (0,040 g, 0,26 mmol) est dissous dans 50 mL d'une solution diluée d'acide acétique dans l'éthanol absolu (0,16 % vol.). Les plaques sont immergées pendant 3 h dans le milieu réactionnel maintenu à 50 °C et sous agitation magnétique. Elles sont ensuite abondamment rincées avec de l'éthanol puis séchées.

B.V.2.2. Hydrolyse acide des imines

L'hydrolyse des imines est réalisée en milieu acide : les plaques sont immergées pendant 1 h dans 50 mL d'acide acétique dilué (0,16 % vol.), à 30°C et sous agitation magnétique, après quoi elles sont rincées à l'eau puis séchées.

B.V.3. Dosage des fonctions amine des supports par CouCHO

B.V.3.1. Formation des imines

La 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (0,033 g, 0,13 mmol) est dissoute dans 50 mL d'une solution diluée d'acide acétique dans l'éthanol absolu (0,16 % vol.). Les plaques sont immergées pendant 4 h dans le milieu réactionnel maintenu à 50 °C et sous agitation magnétique. Après greffage, les plaques sont rincées 3 h dans l'éthanol absolu, puis 2 h dans le dichlorométhane anhydre, sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, puis elles sont séchées.

B.V.3.2. Hydrolyse acide des imines

Les plaques sont immergées dans 50 mL d'acide acétique dilué (0,16 % vol.) pendant 1 h, à 30°C et sous agitation magnétique. Après hydrolyse acide des imines, les plaques sont rincées 2 h dans l'éthanol absolu, puis 1 h dans le dichlorométhane anhydre, sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, après quoi elles sont séchées.

B.V.4. Greffage du traceur fluorescent cinnamilydène sur les lames S

B.V.4.1. Activation sous forme d'ester de succinimidyle du composé CiCOOH

A l'acide 2-cyano-5-(4-(N,N-diméthylamino)phényl)-2,4-pentadiénoïque (0,484 g, 2 mmol) en suspension dans 20 mL de dichlorométhane anhydre, sont ajoutés successivement le NHS (0,253 g, 2,2 mmol, 1,1 éq.) et l'EDAC.HCl (0,422 g, 2,2 mmol, 1,1 éq.). On laisse réagir 22 h, sous agitation magnétique et à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (éluant : EtOH/CH_2Cl_2, 10/90, v/v).

Après addition d'eau, le produit brut est extrait plusieurs fois avec du dichlorométhane. La phase organique, séchée sur sulfate de sodium puis filtrée, est évaporée sous pression réduite ; le résidu est alors purifié sur colonne de silice (éluant : EtOH/CH_2Cl_2, 10/90 puis 20/80, v/v, puis EtOH pur). On obtient 0,328 g de cristaux rouge foncé (1 mmol, 48 %).

Formule brute: $C_{18}H_{17}N_3O_4$

M = 339 $g.mol^{-1}$

RMN ^1H ($CDCl_3$)

2,88 (4H, s, -C**H**$_2$ du NHS)

3,12 (6H, s, -N(C**H**$_3$)$_2$)

6,70 (2H, d, méta Ar), J = 9 Hz

7,13 (1H, dd, ArCH=C**H**-), J = 12 Hz, J = 14,7 Hz

7,34 (1H, d, ArC**H**=CH-), J = 14, 7 Hz

7,54 (2H, d, ortho Ar), J = 9 Hz

8,09 (1H, d, -C**H**=C(CN)CO-), J = 12 Hz

B.V.4.2. Greffage du composé CiNHS sur les lames S

Le composé CiNHS (0,075 g, 0,22 mmol) est préalablement dissous dans 3 mL de DMF complétés avec 25 mL d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (5.10^{-2} mol/L) à pH 8,5. Les lames S sont immergées dans cette solution pendant 4 h, sous légère agitation magnétique, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Elles sont ensuite soigneusement rincées par immersion dans différents solvants (3 h dans H_2O, 2 h dans EtOH, 1 h dans CH_2Cl_2), sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, puis séchées.

B.V.5. Greffage du dérivé coumarine acide CouCOOH sur les lames S

B.V.5.1. Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique

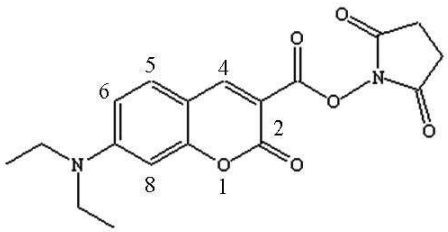
Le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde (3,86 g, 20 mmol) et la 2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione (2,88 g, 20 mmol) sont dissous dans 10 mL d'éthanol auxquels sont ajoutés la pipéridine (0,040 mL, 0,4 mmol) et l'acide acétique (0,023 mL, 0,4 mmol) introduits en quantité catalytique. On laisse d'abord réagir 20 min à température ambiante et sous agitation magnétique, puis 2 h à reflux. Après avoir laissé refroidir le mélange réactionnel, le précipité formé est filtré puis lavé à l'éthanol et à l'éther. On obtient 3,891 g de cristaux jaune orange (15 mmol, 75 %).

Formule brute: $C_{14}H_{15}NO_4$
M = 261 $g.mol^{-1}$
PF = 229 °C ; Litt. : 222-224 °C [Song *et al.*, 2003]

B.V.5.2. Activation sous forme d'ester de succinimidyle du composé CouCOOH

A l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique (0,522 g, 2 mmol) en suspension dans le dichlorométhane (20 mL), sont ajoutés successivement le NHS (0,253 g, 2,2 mmol, 1,1 éq.) et l'EDAC.HCl (0,422 g, 2,2 mmol, 1,1 éq.). On laisse réagir 24 h, sous agitation magnétique et à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (éluant : EtOH/CH_2Cl_2, 10/90, v/v) et le produit est isolé de la même manière que CiNHS. On obtient 0,546 g de cristaux jaunes (1,5 mmol, 76 %).

Formule brute: $C_{18}H_{18}N_2O_6$
M = 358 $g.mol^{-1}$



RMN ^{1}H ($CDCl_3$)

1,27 (6H, t, -N($CH_2C\mathbf{H_3}$)$_2$)

2,89 (4H, s, C$\mathbf{H_2}$ du NHS)

3,49 (4H, q, -N(C$\mathbf{H_2}CH_3$)$_2$)

6,47 (1H, d, H8), J = 2,2 Hz

6,64 (1H, dd, H6), J = 2,4 Hz, J = 9 Hz

7,38 (1H, d, H5), J = 9 Hz

8,59 (1H, s, H4)

B.V.5.3. Greffage du composé CouNHS sur les lames S

Le composé CouNHS (0,036 g, 0,10 mmol) est préalablement dissous dans 1 mL de DMF complété avec 19 mL d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à pH 8,5. Les lames S sont immergées 4 h dans cette solution, sous légère agitation magnétique, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Elles sont ensuite soigneusement rincées par immersion dans différents solvants (3 h dans H_2O, 3 h dans EtOH, 2 h dans CH_2Cl_2) sous agitation magnétique, puis séchées.

B.VI. Conclusion sur les greffages sur supports

Nous avons dans cette partie étudié le greffage covalent de traceurs fluorescents sur des lames de verre fonctionnalisées avec un amino-silane. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi d'utiliser des supports commerciaux, à savoir des lames de verre silanisées -NH_2 en surface (lames S), que nous avons caractérisé du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques : nous avons pu vérifier le caractère hydrophobe des supports et nous avons constaté qu'ils présentaient une fluorescence intrinsèque non négligeable, par ailleurs homogène. Bien que nous ne soyons pas parvenus à déterminer avec certitude leur recouvrement surfacique en fonctions amine, l'ordre de grandeur trouvé semble cependant correct ($4{,}6.10^{-10}$ mol/cm^2).

Nous avons ensuite réalisé le greffage covalent de différents traceurs fluorescents sur ces supports. Nous avons utilisé 3 composés déjà étudiés au laboratoire pour d'autres applications :

- deux composés acides, notés CiCOOH et CouCOOH, activés sous forme d'esters de succinimidyle et greffés sur les lames silanisées par une liaison amide,
- un dérivé coumarine aldéhydique noté CouCHO, greffé via une liaison imine sur les supports.

Les greffages ont été analysés en spectrofluorimétrie : les analyses ont révélé que nous étions parvenus à greffer avec succès les 3 traceurs fluorescents sur les lames S ; leurs caractéristiques en excitation et en émission de fluorescence sont les suivantes :

	λ_{exc}	$\lambda_{ém}$
CiCOOH	470	565
CouCOOH	≈ 410	≈ 467
CouCHO	423	470
lames S	*423*	*530*

Etant donné que les deux traceurs fluorescents acides présentent des caractéristiques spectrales très distinctes (maxima en excitation et en émission, intensité de fluorescence), et

ce également par rapport aux supports commerciaux, et que par ailleurs leur greffage est réalisé dans les mêmes conditions (solution aqueuse de bicarbonate de sodium à pH 8,5), ils ont été retenus pour l'étude de la localisation des greffages (partie D). Le composé CouCHO sera lui utilisé pour contrôler les différentes étapes entrant dans la préparation des supports fonctionnalisés (partie E).

Après avoir démontré qu'il était possible de réaliser des greffages covalents sur les supports commerciaux, nous allons à présent étudier leur localisation. Nous avons opté pour une méthode utilisant la stéréolithographie et qui consiste à isoler les greffages à l'intérieur de puits physiques en polymère. Les polymérisations vont être réalisées à même les supports après étalement d'une résine liquide hydrophobe, ce qui est rendu possible par le caractère hydrophobe des lames utilisées.

Nous avons également développé une variante à cette méthode, qui a pour principe de protéger temporairement avec un polymère certains sites réactionnels bien définis, au niveau desquels les greffages pourront être réalisés ultérieurement. Cette étude va faire l'objet de la prochaine partie.

3ème partie : Partie C

C. LOCALISATION DES SITES RÉACTIONNELS

Introduction

Ce travail a pour objet la réalisation de greffages covalents et localisés de molécules biologiques sur des supports plans. La localisation des greffages sous-tend une miniaturisation des systèmes étudiés, les sites réactionnels ainsi "isolés" pouvant être assimilés à des mini réacteurs. Ces mini réacteurs étant indépendants les uns des autres, ils sont le siège de réactions qui leur sont propres, et différentes réactions peuvent alors être conduites sur un même support. Il sera alors permis d'analyser différentes interactions biologiques de type sonde/cible sur une même plaque. Par ailleurs, du fait de la miniaturisation, les quantités des réactifs mis en jeu pour élaborer ce biocapteur seront diminuées, ainsi que les volumes des échantillons soumis à l'analyse. Enfin, si nous parvenons à contrôler parfaitement la localisation des sites réactionnels sur les lames, il sera alors aisé d'adapter ces supports aux systèmes automatisés déjà existants de dépôt des échantillons et/ou de détection des réactions spécifiques se produisant au niveau de ces sites.

Nous allons dans cette partie décrire les méthodes de localisation employées : elles sont basées sur la polymérisation à même les supports d'une résine photosensible, pour former des puits ou des plots en polymère. Ceci est réalisé grâce à la stéréolithographie, technique qui permet de polymériser localement une résine par irradiation laser. Afin de quantifier la précision des motifs réalisés, les résultats de nos expériences seront analysés par profilométrie optique.

C.I. Mise en oeuvre de la stéréolithographie

Le terme lithographie, qui vient de lithos (pierre) et de graphie (dessin), désigne l'art de reproduire par impression les dessins tracés avec une encre ou un crayon gras sur une pierre calcaire. La stéréophonie étant une technique de reconstitution spatiale (de source sonore), son mariage avec la lithographie est tout d'abord un rapprochement entre l'art et la technique.

La stéréolithographie (SL) est une technique relativement récente: elle a été développée quasi-simultanément par Hull (1984) aux Etats-Unis et André *et al.* (1984) au laboratoire. C'est le début du prototypage rapide par photofabrication 3D résolue spatialement.
La stéréolithographie a pour principe la polymérisation localisée dans l'espace d'une résine liquide en un polymère solide, sous l'action d'une source d'énergie lumineuse. Le procédé classique, maintenant largement industrialisé, permet de fabriquer des objets volumiques de formes complexes, par une méthode additive de couches. Il permet de travailler avec des temps de fabrication courts et suivant un processus totalement informatisé et automatique, depuis la conception assistée par ordinateur (CAO), jusqu'à la réalisation effective de l'objet.
L'évolution majeure de cette technique consiste maintenant à réaliser des pièces fonctionnelles et plus précises. C'est pourquoi, cette technologie sensible a depuis connu de nombreux développements soit en terme de matériau [Hinczewski *et al.*, 1998 ; Dufaud & Corbel, 2002], soit en terme de procédé, en allant vers la miniaturisation et le procédé de microstéréolithographie [Monneret *et al.*, 2002]. Il semble donc très intéressant de développer le procédé de stéréolithographie à l'échelle de la microfabrication, pour subvenir aux besoins toujours plus grands de pièces miniatures complexes, que les techniques de microfabrication basées sur l'emploi du silicium ne peuvent pas forcément produire.

C.I.1. Description du procédé

Le principe de la stéréolithographie repose donc sur la photopolymérisation résolue dans l'espace d'une résine liquide en un polymère solide (résine négative). Elle permet de fabriquer des objets tridimensionnels de forme complexe, par déflexion d'un faisceau laser sur la

surface du photopolymère. Cette méthode de balayage des couches point par point définit la technique de SL dite "conventionnelle".

L'objet à construire est généralement défini à partir d'une conception assistée par ordinateur. Le fichier ainsi obtenu est alors tranché numériquement de manière à définir les différentes sections de l'objet qui seront reconstruites séquentiellement par la machine de fabrication.

Le principe global de cette machine est schématisé sur la figure 29. Un faisceau laser émettant généralement dans l'ultraviolet, est focalisé sur la surface de la résine. Deux miroirs galvanométriques déplacent le spot laser sur la surface du bain liquide dessinant un motif correspondant à la section courante de l'objet en cours de fabrication. L'objet repose sur une grille support qui s'enfonce progressivement dans la résine liquide, permettant le recouvrement de l'objet par une nouvelle couche de résine liquide d'épaisseur contrôlée.

La cohésion de la pièce est assurée dès que l'épaisseur de polymérisation est suffisante pour permettre l'accrochage de deux couches successives. Typiquement, cette épaisseur est comprise entre 40 et 100 microns. Ce paramètre dépend principalement de l'énergie apportée lors de l'étape de polymérisation, mais aussi des propriétés de transmission et de réactivité de la formulation utilisée. La vitesse de fabrication typique est de une couche par minute.

L'objet ainsi polymérisé couche après couche est insoluble dans la résine liquide, qui est en fin de procédé dissoute dans un solvant (*révélation*). L'objet solide est alors séché puis exposé sous lampe UV pour terminer la polymérisation.

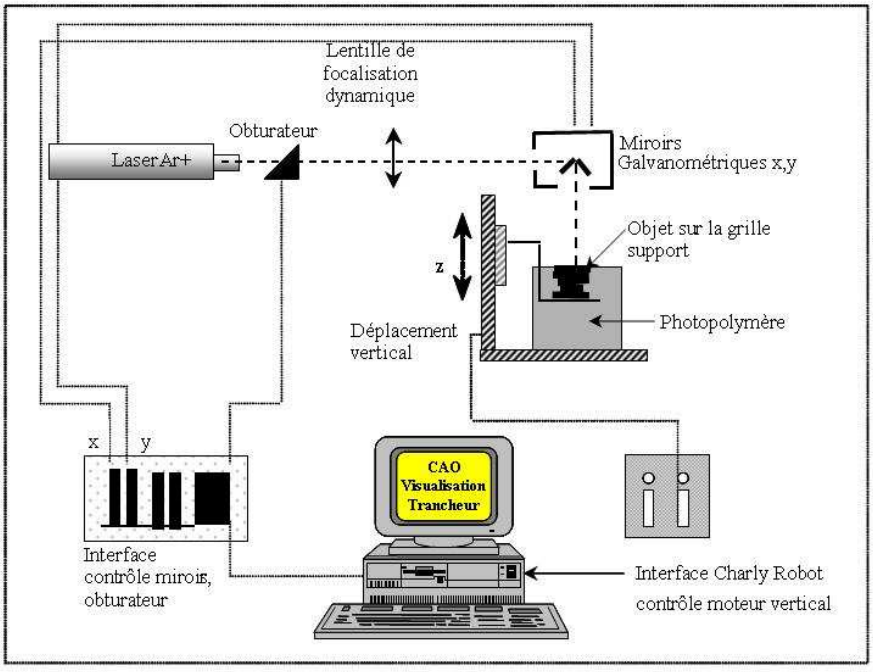


Figure 29 **Schéma du procédé conventionnel de stéréolithographie**

Après avoir présenté brièvement le principe général de la technique de stéréolithographie, il est nécessaire maintenant de décrire plus en détail le procédé, en identifiant la machine et ses différents composants.
Une machine de stéréolithographie (cf. Figure 29) nécessite la mise au point de trois sous-ensembles principaux qui sont les suivants :

- Un système informatique, qui comprend l'ordinateur avec un logiciel de pilotage des interfaces pour le tracé des couches et leur empilement. Dans notre cas, nous allons effectuer la polymérisation monocouche d'une matrice de puits ou de plots : nous avons alors créé un logiciel spécifique de pilotage pour tracer de manière répétitive un motif bien défini.
- Un laser émettant dans l'UV.
- Un ensemble opto-mécanique motorisé à plusieurs degrés de liberté, qui défléchit le faisceau sur la surface de la résine.

Chacun de ces éléments va maintenant faire l'objet d'une courte présentation.

Le procédé est intégré dans une chaîne informatique complète permettant la fabrication automatisée de maquettes. La conception assistée par ordinateur traite des informations de plus en plus sophistiquées permettant la création de géométries de plus en plus complexes. A cette opération essentielle est associée la prise de l'information. En effet, une partie des activités du prototypage repose sur l'acquisition des données. Dans le domaine médical, par exemple, le scanner à rayons X est la source d'acquisition des données.
A partir d'un fichier initial, un premier traitement transforme les coordonnées du nuage de points de l'objet en contours correspondant aux tranches successives, qui vont être durcies localement par le faisceau laser. L'ordinateur coordonne ensuite le fonctionnement de l'ensemble des opérations correspondant au durcissement de chaque couche et du recouvrement des strates.

Le laser le plus utilisé est un laser à argon ionisé continu dont les raies les plus intenses sont pour le visible : 457,9 nm (1 W), 488 nm (4 W), 514,5 nm (4 W) et pour l'ultraviolet : 351,1 nm (0,05 W) et 363,8 nm (0,1 W). Pour notre application, nous avons utilisé le ***modèle 2020*** de chez ***Spectra-Physics*** ; nous avons sélectionné la raie UV à 363,8

nm à l'aide d'un miroir sélectif semi-réfléchissant à l'avant du laser, le miroir arrière étant totalement réfléchissant pour les deux raies UV.

Le faisceau laser est défléchi par un jeu de miroirs galvanométriques (Figure 30) positionnés au-dessus de l'échantillon à polymériser et commandés par une interface. Les déplacements sont incrémentés en pas dont la longueur et la durée doivent être définies.

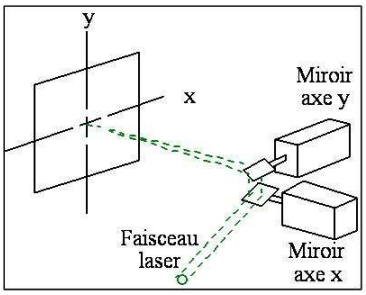


Figure 30 Miroirs galvanométriques servant au traçage du motif polymère

Pour réaliser un motif, il faut que le faisceau laser puisse effectuer deux types de déplacements :

- un balayage permettant de dessiner les contours et le remplissage de chaque section de la pièce,
- des sauts entre les contours, permettant un déplacement sans polymérisation. Ceci est réalisé à l'aide d'un modulateur acousto-optique dont le principe sera décrit dans le paragraphe suivant.

Enfin, l'exposition est définie par l'énergie du faisceau laser rapportée à la surface irradiée.

C.I.2. Méthode d'irradiation

C.I.2.1. Répartition de l'énergie du faisceau laser

Nous utilisons pour la photopolymérisation la raie à 363,8 nm, en mode TEM00 (Mode Transverse Electromagnétique). Un faisceau laser en mode TEM00 présente un profil gaussien ; son intensité se répartie selon la relation suivante :

$$I(r) = I_0 \times \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2(z)}\right)$$

Avec:

I_0 : intensité maximale au centre (r = 0)

I : intensité à la distance r du maximum

r : coordonnée radiale

z : distance le long de l'axe de propagation, prise par rapport au point de focalisation

$w_0(z)$: rayon du faisceau pour lequel l'intensité vaut I_0/e^2

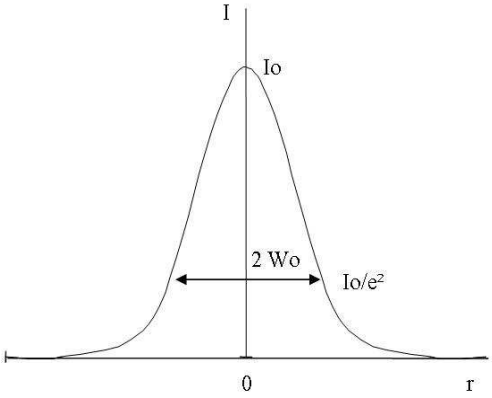


Figure 31 Profil Gaussien

La densité d'énergie lumineuse ("fluence") est calculée par la relation :

$$E = \frac{4 \times P}{\pi \times v \times d_f}$$

Avec :

E : densité d'énergie lumineuse (J/cm^2)

P : puissance délivrée par le laser (W)

v : vitesse de balayage (cm/s)

d_f : diamètre du faisceau incident (cm)

Cette relation permet de définir les paramètres d'irradiation du photomatériau. La densité d'énergie incidente sur la surface de l'échantillon *E*, est proportionnelle à la puissance *P* délivrée par le laser et inversement proportionnelle à la vitesse de balayage *v*. Ce dernier paramètre est fixé par l'utilisateur dans le programme de traçage des motifs. Sa valeur varie en général entre 0,1 et 10 cm/s: dans ce domaine de vitesses, la durée d'exposition de l'échantillon au cours du balayage est bien contrôlée.

C.I.2.2. Autres éléments optiques du montage et réglages

C.I.2.2.a Modulateur acousto-optique

Pour la fabrication des motifs en polymère, nous verrons que le faisceau doit être en cours de lasage, à certains passages, totalement éteint. En effet, en cas d'irradiation de la résine liquide, même avec de faibles énergies lumineuses, il peut y avoir formation de gel.

Une onde acoustique qui se propage dans un milieu solide ou liquide donne, par compressions et raréfactions successives du milieu, un réseau d'indices. Un faisceau lumineux traversant un modulateur acousto-optique sera donc diffracté par ce réseau. Le principe du système obturateur repose sur la sélection au moyen d'un diaphragme d'un faisceau diffracté, au détriment du faisceau incident. On choisit alors le faisceau diffracté le plus intense, d'ordre 1. Lorsque l'obturateur est en mode "fermé", il n'y a pas de diffraction et donc aucune lumière ne passe à travers le diaphragme. En mode "ouvert", le faisceau diffracté sélectionné traverse le diaphragme.

Le principe du système obturateur est schématisé sur la figure 32. Le réglage, ici la sélection du faisceau diffracté d'ordre 1, se fait selon (X, Y, Z, θ) au moyen d'une platine de translation et rotation à micropositionnement.

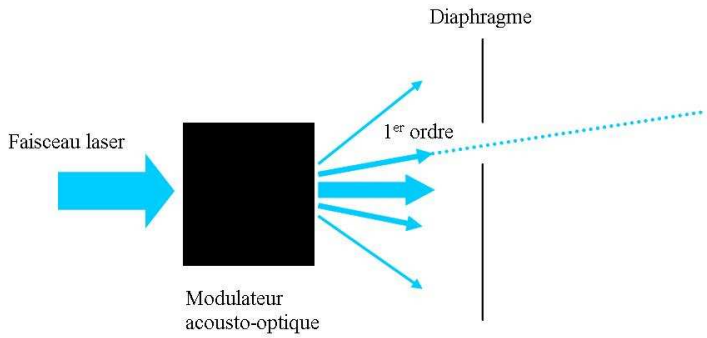


Figure 32 Schéma de principe d'un modulateur acousto-optique (obturateur)

C.I.2.2.b Faisceau laser

On règle la focalisation au moyen d'un analyseur de faisceau en temps réel (***BeamScan de Photon***). Cet appareil est constitué d'un détecteur au silicium auquel est associé un logiciel qui permet de mesurer la largeur et la position du faisceau. On vérifie ainsi que le faisceau est gaussien ; le capteur étant placé au point de focalisation, le logiciel nous donne l'allure de la gaussienne et le diamètre du faisceau en ce point.

C.II. Méthode de localisation des sites

Le principe de la méthode de localisation choisie repose sur la fabrication par la technique de stéréolithographie de motifs en polymère, qui vont de par leur adhésion au support permettre la protection physique de certains sites réactionnels. Deux approches ont été envisagées: la fabrication de puits dans une matrice polymère et la fabrication de plots en polymère.

C.II.1. Puits en polymère

Cette première méthode consiste à isoler des puits réactionnels dans un polymère. Les greffages pourront être réalisés par des dépôts à l'intérieur de ces puits et être ainsi localisés, à condition que le matériau photopolymérisé autour soit imperméable aux solvants.

C.II.1.1. Matrice de puits réactionnels

Après étalement d'une résine photosensible liquide sur toute la surface du support silanisé, des puits en polymère vont être fabriqués par irradiation laser sélective de la résine autour des puits. A l'intérieur, la résine liquide n'ayant pas été irradiée, les sites réactionnels auront été préservés.

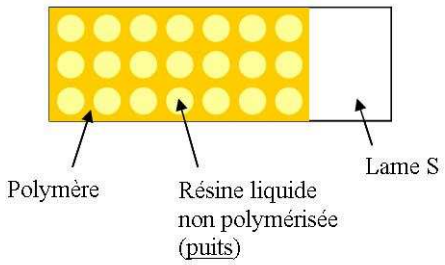


Figure 33 Principe de la fabrication d'une matrice (3×7) puits en polymère

C.II.1.2. Avantages et inconvénients de la méthode

Cette approche permet d'isoler les sites réactionnels à l'intérieur de puits en polymère sur une des deux faces des lames S. La grande souplesse de la technique employée pour la polymérisation sélective de la résine, permet de faire varier les différents paramètres de la matrice : taille de la matrice (a×b), dimensions des puits, espacement entre les puits.
Cette méthode a pour inconvénient que dans le cas d'un support fonctionnalisé sur les deux faces, tel que les lames commerciales S, les greffages covalents ne pourront être réalisés que par des dépôts à l'intérieur des puits. En effet, procéder par immersion du support dans les milieux de greffage conduirait certes au greffage localisé à l'intérieur des puits (pourvu que le polymère soit imperméable et non poreux) mais aussi sur toute l'autre face !
On peut néanmoins contourner ce problème en procédant par mouillage de la surface polymérisée avec les solutions de greffage.

C.II.2. Plots en polymère

Cette seconde approche va permettre de localiser des greffages sur une seule des deux faces fonctionnalisées d'un support. Elle implique cependant une étape supplémentaire : la protection chimique de certains sites réactionnels.

C.II.2.1. Matrice de plots en polymère

Le principe de cette méthode repose sur la fabrication d'une matrice de plots en polymère sur une des deux faces du support. On protège ensuite chimiquement ("capping") tous les sites réactionnels extérieurs au polymère (à l'extérieur des plots sur la face polymérisée et sur toute l'autre surface dans le cas d'un support fonctionnalisé sur les 2 faces), en procédant par immersion de la plaque dans la solution appropriée.

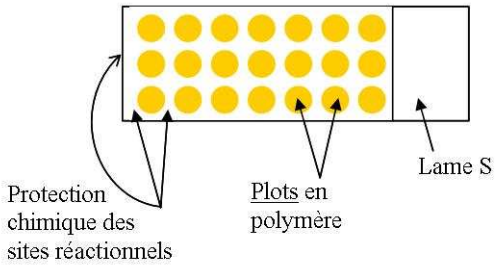


Figure 34 Principe de la fabrication d'une matrice (3×7) plots en polymère

Pourvu que le polymère présente une très bonne adhésion au support, qu'il soit imperméable aux solvants utilisés pour réaliser le capping, et qu'il n'ait pas altéré voire même détruit les fonctions amine qu'il recouvrait, celles-ci auront été préservées. A condition qu'il soit alors possible de séparer le polymère des supports, on peut envisager de décoller les plots et de réaliser des greffages à leur emplacement, en procédant par des dépôts, par mouillage, ou par immersion dans les différentes solutions.

C.II.2.2. Avantages et inconvénients de la méthode

Cette méthode présente l'avantage qu'elle permet de bien localiser des sites réactionnels sur une seule face du support. Il s'agit d'en protéger certains physiquement avec un polymère. Après avoir protégé les sites extérieurs aux plots par un capping chimique, puis décollé les polymères du support, on pourra alors choisir de greffer des molécules par liaison covalente avec les fonctions amine ainsi restituées, en immergeant directement la plaque dans les solutions de greffage.

Cette méthode a pour inconvénient d'impliquer une étape supplémentaire, à savoir la protection chimique de certains sites réactionnels.

C.III. La résine de photopolymérisation : la SU-8 5

La résine que nous avons choisi d'utiliser pour la réalisation des motifs en polymère a été à l'origine spécialement développée pour le domaine de la microfabrication. Il s'agit d'une résine photosensible liquide : la SU-8 5.

C.III.1. Choix de la résine

La résine utilisée pour la photopolymérisation doit satisfaire plusieurs exigences. Tout d'abord, les motifs polymérisés doivent être parfaitement réalisés, et ce avec une grande précision. Pour photopolymériser la résine à même le support, il faut qu'elle puisse s'y étaler de façon homogène sur toute la surface. Le polymère doit posséder d'excellentes propriétés d'adhésion avec les supports utilisés (verre silanisé) et doit être imperméable aux solvants organiques et aqueux. Enfin, il doit être stable chimiquement.
Plusieurs résines de stéréolithographie ont été testées, mais les polymères photofabriqués présentaient une très mauvaise adhésion avec les lames S et se décollaient facilement de leur surface (cf. C.VII).
Nous avons alors choisi d'utiliser une résine particulièrement performante pour la technologie UV et la fabrication de microsystèmes et qui présente par ailleurs de bonnes propriétés d'adhésion avec différents types de surface dont le verre ; il s'agit d'une formulation particulière d'une résine hydrophobe appelée SU-8 : la ***SU-8 5***.

C.III.2. Caractéristiques de la SU-8

La SU-8 est une résine négative, de type époxy (avec des cycles époxydes) qui a été développée au centre de recherche d'IBM aux Etats-Unis [Gelorme *et al.*, 1989]. Elle est photosensible entre 300 et 400 nm, région accessible avec l'équipement conventionnel de photolithographie (365 nm), et sa haute transparence dans le domaine du proche UV permet la fabrication de structures avec des profils presque verticaux. En outre, en raison de la forte

réticulation de la matrice dans le photopolymère résultant du grand nombre de fonctions époxy (8 par molécule de SU-8), celui-ci présente une grande stabilité chimique et thermique (jusqu'à 200 °C), et une tolérance élevée au rayonnement absorbé.
Par ailleurs, la grande solubilité de la molécule SU-8 dans une variété de solvants organiques permet la formulation de résines à haute teneur en solide (SU-8 100 : 73 % mass.) ; la SU-8 5 correspond à la formulation à 52 % mass.
Cette dernière possède de bonnes propriétés d'étalement et lorsqu'elle est réticulée, sa résistance à l'action d'agents chimiques est si grande qu'elle peut être très difficile à séparer des supports.

Pour simplifier la notation, nous désignerons désormais la résine SU-8 5 par le terme "la résine".

C.III.2.1. Composition et données physico-chimiques

Cette résine se présente sous la forme d'un liquide jaune clair. Elle est fournie par ***MicroChem Corp.*** (réf. Y131252) sous un conditionnement de 0,5 L.

Elle est composée :

- d'un monomère à base de diglycidyl éther de bisphénol A novolaque connu sous le nom de résine EPON SU-8 et caractérisé par 8 cycles époxyde :

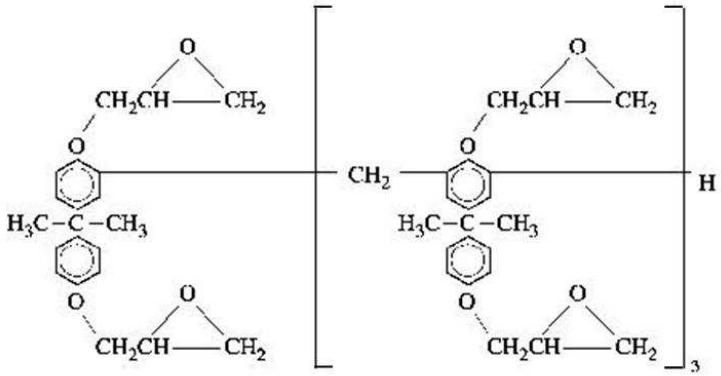


Figure 35 Structure du diglycidyl éther de bisphénol A novolaque (SU-8) [Shaw *et al.*, 1997]

- d'un amorceur cationique : il s'agit d'un mélange de sels d'hexafluoroantimonate (SbF_6^-) et de triarylsulfonium,
- du solvant du monomère : la gamma-butyrolactone (GBL),
- du solvant de l'amorceur : le carbonate de propylène.

(*) Composition chimique (% mass.) :

EPON SU-8	52-55
Gamma-butyrolactone	45-50
Hexafluoroantimonate/triarylsulfonium/ Carbonate de propylène	1-5

(*) Données physico-chimiques :

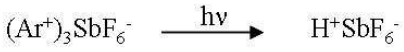
Densité	1,164
Température de transition vitreuse T_g (°C)	204
Température de dégradation T_d (°C)	380
Pression de vapeur à 20 °C (mm Hg)	2
Viscosité cinématique à 25 °C (cSt)	270

C.III.2.2. Mécanisme de la polymérisation

Le mécanisme de réticulation de la résine SU-8 correspond à une polymérisation de type cationique. La photolyse de l'amorceur (hexafluoroantimonate/triarylsulfonium) va générer un acide fort qui va jouer le rôle de catalyseur dans la polymérisation.

(*) Données *MicroChem Corp.*

Soit Ar le mélange aryle sulfonium :



C'est cet acide qui provoque la réticulation de la résine lors du recuit post-insolation.

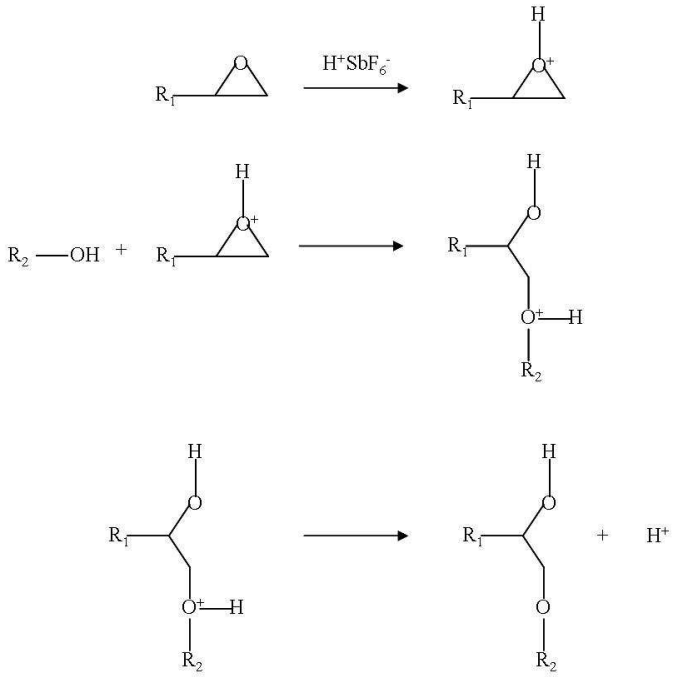


Figure 36 Mécanisme de la polymérisation cationique [Guerin]

La polymérisation se fait par ouverture du cycle de l'époxyde.

C.IV. Fabrication des motifs en polymère

La fabrication des motifs en polymère (puits ou plots) nécessite plusieurs étapes depuis la préparation de la résine à la photopolymérisation jusqu'aux traitements de post-polymérisation.

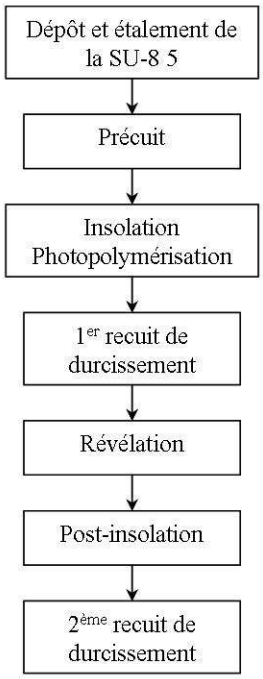


Figure 37 Protocole de fabrication des motifs en polymère

C.IV.1. Protocole de pré-polymérisation

C.IV.1.1. Dépôt et étalement de la résine sur le support

Avant d'y déposer la résine, les supports sont rincés à l'acétone puis séchés. Les polymérisations vont être réalisées sur une seule face du support et uniquement sur la partie aminée de la surface des lames S.

Le dépôt homogène de la résine liquide sur toute la surface silanisée du support se fait au moyen d'une tournette ou "spin coater" (Karl Süss, RC Spin Coater CT62 V08). Cette technique, à la fois simple et économique, permet la réalisation rapide de films minces comme

de films épais. 2 mL de SU-8 5 sont prélevés à la pipette et déposés au centre de la lame ; cette dernière est elle-même disposée au centre d'un plateau circulaire et y est maintenue par aspiration. La rotation du plateau engendre une force centrifuge qui provoque l'étalement de la résine.

Plus précisément, l'étalement se déroule en deux étapes :

- Le pré-étalement : il correspond à l'étalement de la résine sur toute la surface du support. Il est réalisé avec de faibles vitesses de rotation du plateau (v_1), pendant un temps assez court de l'ordre de quelques secondes (t_1).
- L'étalement : il permet l'obtention de films plus ou moins épais en fonction de la vitesse de rotation du plateau. Les vitesses (v_2) sont supérieures à celles appliquées précédemment et la rotation est maintenue pendant un temps (t_2) plus long (quelques dizaines de secondes).

Pour ces deux étapes, on fixe par ailleurs les valeurs des accélérations permettant d'atteindre les paliers de vitesses de rotation : γ_1 entre v = 0 et v_1, et γ_2 entre v_1 et v_2.

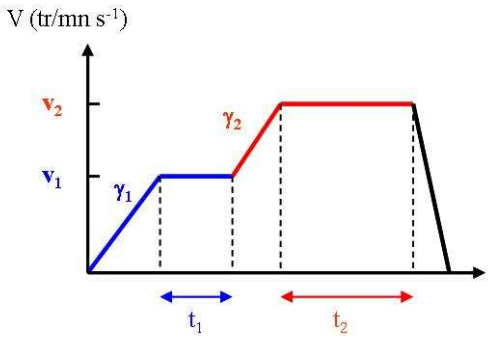


Figure 38 Etalement de la résine au "spin coater"

On réalise avec la SU-8 5 des films ayant une épaisseur voisine de 30 µm, en appliquant pour ces deux étapes les paramètres regroupés dans le tableau ci-dessous :

Etape	Accélération $\boldsymbol{\gamma}$(tr/min/s)	Vitesse $\boldsymbol{v}$ (tr/min)	Durée $\boldsymbol{t}$ (s)
Pré-étalement	100	500	5
Étalement	300	600	30

Tableau 5 Paramètres appliqués à la tournette pour l'étalement de la SU-8 5

A la fin du cycle, la résine est uniformément répartie sur toute la surface de la lame qui est silanisée, ce qui permet de confirmer le caractère hydrophobe conféré au verre fonctionnalisé par l'APTS.

C.IV.1.2. Précuit

Après l'étape d'étalement de la résine, on effectue un précuit sur une plaque chauffante horizontale. Ce précuit permet l'évaporation uniforme du solvant et va permettre aux brins des chaînes de polymère de réticuler. D'après *MicroChem Corp.*, il convient de procéder par paliers de température pour une épaisseur de polymère comprise entre 7 et 15 µm : 2 min à 65 °C, puis 5 min à 95 °C ; Zhang *et al.* (2001) effectuent un précuit à 95 °C pendant un temps plus long : entre 8 et 15 min pour une épaisseur de 13 µm, et entre 12,5 et 15 min pour une épaisseur de 30 µm. Dans notre cas, nous avons trouvé que 5 minutes de précuit à 95 °C suffisaient pour assurer une bonne polymérisation de la résine. En effet, le problème majeur rencontré lors de cette étape est la formation de bulles d'air consécutive à l'évaporation du solvant : c'est pourquoi, nous avons choisi pour le précuit d'opérer avec un temps aussi court.

C.IV.2. Protocole de photopolymérisation

La technique de stéréolithographie décrite précédemment a été utilisée pour photopolymériser la résine étalée sur le support. Par rapport au procédé traditionnel de prototypage rapide de fabrication d'objets, nous ne nous intéressons qu'à une monocouche. La résine a bien évidemment été choisie en conséquence (cf. C.III.).

C.IV.2.1. Description du balayage laser d'un motif

L'irradiation de la surface à photopolymériser s'effectue par lasage ligne après ligne, dans le sens horizontal et/ou vertical, avec un pas défini par l'opérateur.

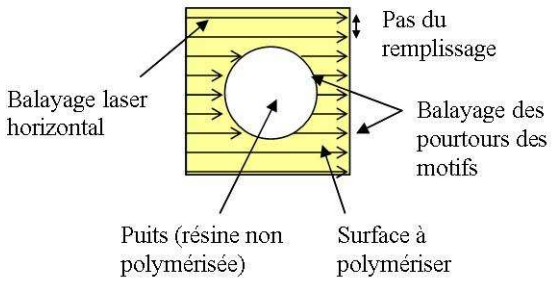


Figure 39 Lasage horizontal pour la fabrication d'un puits en polymère

Dans l'exemple présenté ci-dessus, l'irradiation doit donc se faire uniquement de part et d'autre du puits, c'est à dire que lorsque le faisceau laser se déplace au dessus du puits, il doit être obturé. Ceci est réalisé à l'aide du modulateur acousto-optique décrit précédemment (cf. C.I.2.2.a). Il est activé de façon synchronisée au cours du balayage, par l'interface de commande de l'automate.

C.IV.2.2. Programme de pilotage de l'automate

En général, le motif est issu du tranchage d'un fichier 3D conçu par CAO et est tracé à l'aide du programme de fabrication de pièces en 3D qui gère à la fois le traçage des motifs et la superposition des couches.
Dans notre cas, ce programme de fabrication est mal adapté pour les raisons suivantes :

- Nous effectuons la polymérisation d'une monocouche, et nous n'avons donc pas de véritable objet 3D ; la conception par CAO paraît donc inadaptée, et de plus, rajoute une étape de tranchage inutile.
- Le programme de fabrication de pièces ne permet pas de gérer d'une manière précise le remplissage. En effet, nous voulons avoir toute liberté de choix sur le sens de balayage (horizontal ou vertical), le pas du remplissage, et les paramètres géométriques du motif.

C'est pourquoi, nous avons écrit un programme de fabrication en langage C : ce programme permet de tracer directement le motif en fonction des paramètres géométriques et de remplissage, sans passer par les étapes habituelles de CAO, tranchage, et fabrication.
La difficulté d'écrire ce programme réside dans le remplissage qui doit tenir compte en chaque point de coordonnées (x,y) de la position à l'intérieur ou à l'extérieur du cercle. Pour

ce faire, nous regardons pour chaque point élémentaire d'où part le vecteur de remplissage, si la distance par rapport au centre du cercle est supérieure au rayon. Si la condition est remplie, on trace un vecteur élémentaire de remplissage, et on passe au vecteur suivant en incrémentant de dix sur la ligne. Sinon, on ne trace pas de vecteur de remplissage et on passe au point suivant.

C.IV.2.3. Protocole de photopolymérisation

Le rayon laser reproduit automatiquement le motif prédéfini par l'opérateur, qui peut alors choisir de le dupliquer à volonté dans les 2 directions orthogonales, et ce dans les deux sens (droite, gauche, en haut, en bas). Le programme permet de définir à la fois les caractéristiques géométriques du motif (dimensions, espacement entre 2 motifs) et les paramètres de traçage (remplissage ou non du motif et traçage des contours, intervalle de lasage, balayage dans une ou deux directions, vitesse de balayage). Le motif de base retenu pour la fabrication des motifs en polymère correspond à un cercle centré dans un carré. Pour la réalisation des puits, la résine est photopolymérisée à l'extérieur du cercle, et dans le cas des plots, à l'intérieur.

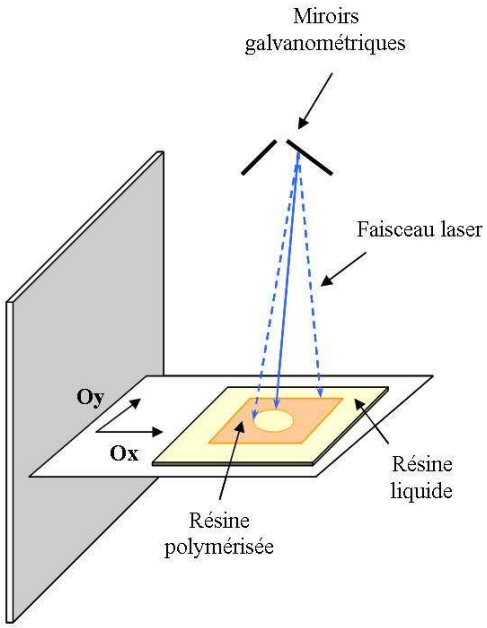


Figure 40 Schéma de la photopolymérisation : fabrication d'un puits en polymère

D'après Zhang *et al.* (2001), pour fabriquer des motifs de 30 µm d'épaisseur avec des profils bien définis, la densité d'énergie requise lors de l'irradiation doit être égale à 185 mJ/cm^2. Si la résine est sous-exposée, la réticulation ne pourra se faire correctement et lors de la

révélation, toute la résine sera dissoute. En revanche si la résine est surexposée, les flancs ne seront plus verticaux.

Dans notre cas, la densité d'énergie requise correspond à 300 mJ/cm^2. Etant donné qu'au point de focalisation le diamètre moyen du faisceau a été mesuré proche de **200 µm**, les paramètres de lasage (puissance et vitesse de balayage) ont été imposés comme suit :

	Diamètre moyen du faisceau (µm)	Puissance (mW)	Vitesse de balayage (cm/s)
Densité d'énergie *300 mJ/cm^2*	200	15	3

Tableau 6 Paramètres d'irradiation appliqués pour la fabrication des motifs en polymère

La puissance est mesurée au moyen d'un mesureur de puissance laser (Spectra-Physics, modèle 407A). Cet appareil est pourvu d'un détecteur thermique dont le principe consiste à convertir de la lumière en chaleur, qui est elle-même convertie en un signal électrique.
Le modèle 407A utilise comme détecteur thermique une thermopile, et peut supporter des densités de puissance pouvant atteindre 20 kW/cm^2.

Etant donné la valeur moyenne du diamètre du faisceau (≈ 200 µm), le balayage laser à été réalisé avec un pas égal à 100 µm. En effet, le remplissage s'effectuant ligne après ligne, avec un tel intervalle de lasage il ne doit pas subsister d'espaces non polymérisés, comme l'illustre le schéma présenté ci-après :

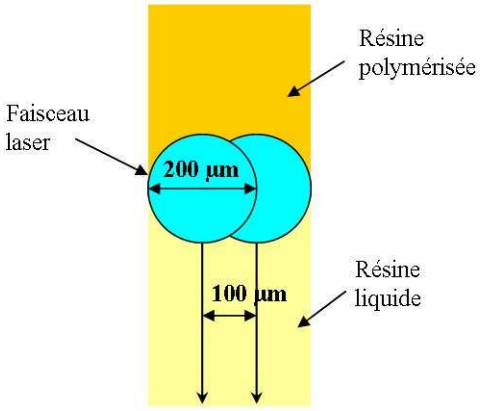


Figure 41 Schéma de remplissage d'un motif par balayage laser

Cela équivaut à un deuxième passage du laser en chaque point. Par ailleurs, pour assurer une meilleure réticulation du polymère, le balayage laser est réalisé dans les deux directions orthogonales X et Y.

C.IV.3. Protocole de post-polymérisation

Après l'insolation, il convient de suivre un protocole bien précis en 4 étapes. On commence par effectuer un premier recuit sur plaque chauffante, d'une part pour provoquer la réticulation du polymère, et d'autre part, pour diminuer la viscosité de la résine liquide, ce qui va faciliter le rinçage au cours de l'étape dite de "révélation". Le polymère est ensuite mis à post-polymériser sous lampe UV, puis une nouvelle fois sur plaque chauffante.

C.IV.3.1. Premier recuit de durcissement

Après l'étape de photopolymérisation, on effectue un premier recuit sur une plaque chauffante. Ce recuit vient initier la réticulation du polymère et permet la diffusion de l'acide ; il y donc interaction avec l'insolation. Par ailleurs, il diminue encore le pourcentage de solvant ainsi que la viscosité de la résine non polymérisée, ce qui va permettre de l'enlever plus facilement au cours de l'étape de révélation.

Concernant cette étape, les protocoles décrits dans la littérature par Zhang *et al.* (2001) et par *MicroChem Corp.* diffèrent. Pour une épaisseur de polymère égale à 30 µm, Zhang *et al.* (2001) effectuent un post recuit à 95 °C d'une durée de 20 à 25 min, et pour une épaisseur de 13 µm cette étape dure 15 à 20 min ; ***MicroChem Corp.*** suggère pour une épaisseur comprise entre 7 et 15 µm, de procéder de nouveau par paliers de température : 1 min à 65 °C, puis 1 à 2 min à 95 °C.

Nous avons pu remarquer que la résine non photopolymérisée, mise à "recuire" sur plaque chauffante, gélifiait, voire même polymérisait, sous l'effet de la température après 15 min de recuit à 95 °C, ce qui n'était pas pour améliorer et faciliter le rinçage !
Par ailleurs, 2 min de recuit à 95 °C permettent de correctement rincer le polymère lors de l'étape de révélation, sans le dissoudre ou le décrocher du support. Mais les motifs se sont

dans ce cas avérés être perméables aux solvants organiques comme aqueux et se décrochent ultérieurement du support après immersion prolongée (quelques heures) dans des solvants organiques.

C'est pourquoi nous avons procédé à deux recuits : un premier, pendant un temps assez court, juste après l'insolation et avant la révélation, et un deuxième, plus long, après l'étape d'irradiation post-polymérisation.
Le premier recuit de durcissement a donc été réalisé à 95 °C et dure 2 minutes.

C.IV.3.2. Révélation

L'étape de révélation permet de séparer la résine liquide du polymère. Elle est réalisée par immersion des plaques polymérisées dans l'acétate de l'éther monométhylique du propylène glycol (PGMEA), sous agitation, pendant environ 5 minutes.
Le PGMEA ou "SU-8 developper" est fourni par ***MicroChem Corp.*** (réf. Y020100).

C.IV.3.3. Irradiation post-polymérisation

Pour permettre une réticulation poussée du polymère, la plaque, bien rincée et séchée, est réexposée 15 min sous lampe UV.

C.IV.3.4. Deuxième recuit de durcissement

Ainsi qu'il a été dit précédemment (cf. C.IV.3.1.), on effectue un second recuit, prolongé cette fois-ci, pour permettre à la fois une réticulation complète du polymère et une bonne adhésion avec le support.
Cette opération est réalisée sur plaque chauffante à 95 °C et dure 30 minutes.

C.IV.4. Protocole global

Les différentes étapes du protocole détaillé de fabrication des motifs en polymère sont récapitulées sur la figure 42.

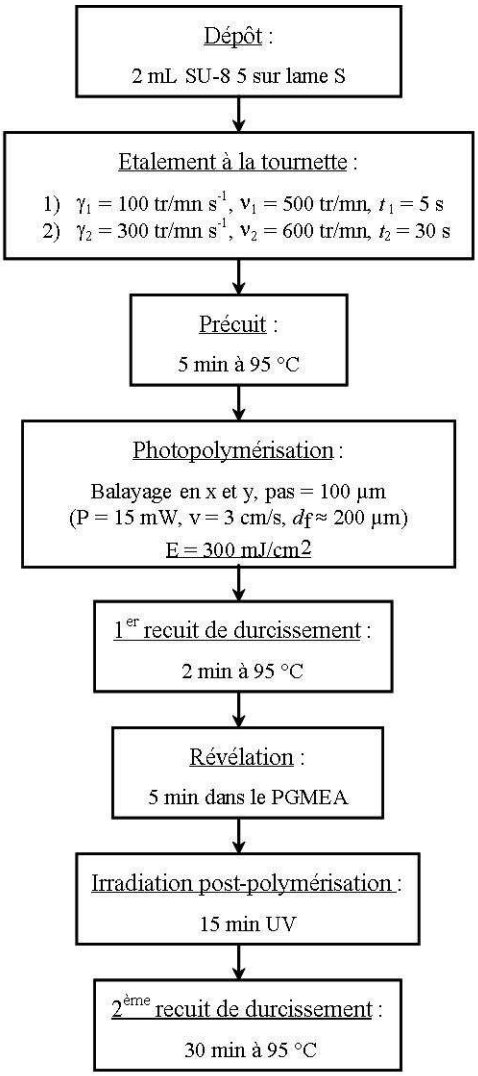


Figure 42 Protocole détaillé de la fabrication des motifs en polymère

C.V. Analyse par profilométrie optique

Les motifs en polymère ainsi photofabriqués à partir de la SU-8 5 ont été analysés au profilomètre optique sur un modèle ***Microfocus UBM***. Cet appareil permet d'obtenir des profils de surfaces et de lignes avec une bonne résolution latérale et verticale.

C.V.1. Principe de la profilométrie optique

Le principe de cet appareil est schématisé sur la figure 43. Un faisceau laser infrarouge émis par une diode est focalisé par une lentille collimatrice et un objectif sur l'échantillon. La lumière réfléchie par la surface analysée est dirigée via un séparateur de faisceau à travers un prisme pour former deux spots analysés par deux photodiodes. Lorsque la distance entre l'objectif et l'échantillon est égale à la distance focale, les deux diodes sont illuminées de la même façon. Si cette distance change, l'illumination des deux diodes devient différente, et un signal d'erreur de focalisation est généré. Un système de translation magnétique corrige la position de l'objectif mobile pour annuler ce signal d'erreur. Le système est asservi pour que la distance entre l'objectif et l'échantillon soit constante (focalisation dynamique). Une mesure de profil consiste donc à enregistrer les déplacements de l'objectif au cours du balayage de la surface de l'échantillon. L'échantillon est posé sur une table de déplacement micrométrique xy. L'ensemble (capteur optique + table) est piloté par ordinateur.

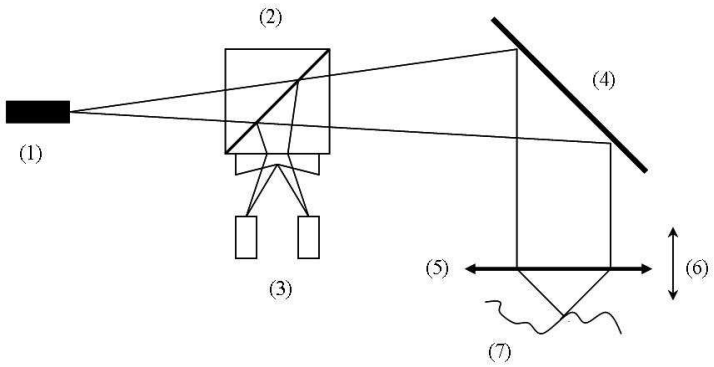


Figure 43 Schéma de principe du profilomètre optique
(1) Diode laser (2) Prisme (3) Photodiodes (4) Séparateur de faisceau (5) Système de focalisation: lentille et objectif (6) Système de translation magnétique verticale (7) Echantillon

C.V.2. Analyse au profilomètre optique

L'appareil peut réaliser au choix des profils de surfaces ou de lignes. La résolution maximum en x et y est de 0,5 µm (2 000 points de mesure par mm). En z, deux gammes de mesures sont disponibles : ± 50 µm et ± 500 µm ; leur résolution théorique est de 10 nm et 0,1 µm respectivement.
Pour l'enregistrement d'un profil de ligne ou de surface, on est limité dans les dimensions en x et y à 50 mm, et à environ 12 000 points de mesure par profil. C'est pourquoi, les profils de lignes ont été mesurés avec un pas de 200 points/mm au maximum soit une résolution de 5 µm, et les profils de surfaces avec un pas de 10 à 20 points/mm soit une résolution de 50 à 100 µm.

Le logiciel associé au profilomètre permet d'extraire à partir des profils de surfaces, des profils de lignes.

Traitement des fichiers :

- Les fichiers correspondant aux profils de lignes sont traités sous Excel.
- Les fichiers correspondant aux profils de surfaces peuvent être traités avec le logiciel **TOPOSURF 3D**. Il s'agit d'un logiciel d'imagerie des états de surface, conçu et développé de telle sorte que l'utilisateur ait à sa disposition le maximum d'outils de traitement numérique, lui permettant une analyse de la surface la plus complète possible.

C.VI. Résultats des analyses réalisées avec le profilomètre optique

Nous allons dans cette partie présenter les résultats des analyses réalisées avec le profilomètre optique : il s'agit des profils de surface et de ligne des motifs photofabriqués. Les profils de ligne ont été dans la plupart des cas directement extraits des profils de surface.

C.VI.1. Puits en polymère

Des puits en polymère ont été photofabriqués selon le protocole décrit au paragraphe C.IV.4.

C.VI.1.1. Photofabrication de puits de grandes dimensions

Nous avons tout d'abord polymérisé des puits de grandes dimensions (de l'ordre de la dizaine de mm), le premier objectif étant de vérifier que les motifs étaient correctement reproduits du point de vue géométrique (forme et dimensions) par photopolymérisation.
Le lasage étant assisté par ordinateur, nous avons défini dans le programme le motif de base, à savoir un cercle de 13 mm de diamètre centré dans un carré de 17 mm de côté. Nous avons ainsi photofabriqué, en dupliquant une fois le premier motif, 2 puits identiques, théoriquement espacés bords à bords de 4 mm, comme illustré sur le schéma ci-dessous :

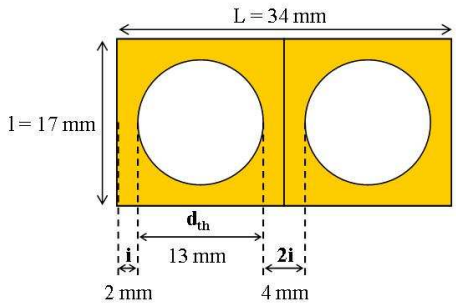


Figure 44 Cotes théoriques pour la fabrication de deux grands puits

Remarque : Il est important de considérer qu'il s'agit là de coordonnées théoriques. En effet, soit d_{th} le diamètre théorique du cercle et soit d_f le diamètre moyen du faisceau, étant donné que le lasage comprend le tracé du cercle, cela revient à tracer un cercle plus petit, de diamètre (d_{th} - d_f). Le schéma présenté ci-dessous illustre ce point :

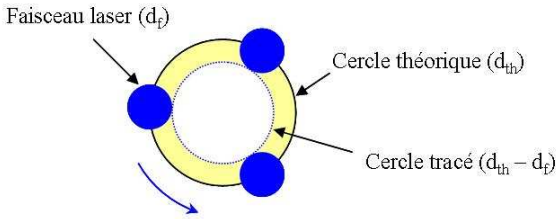


Figure 45 Tracé au laser d'un cercle de diamètre théorique d_{th}

Ainsi, définir un diamètre de cercle égal à 13 mm, revient en réalité à tracer des puits de 12,8 mm de diamètre, puisque le faisceau laser mesure en moyenne 200 µm de diamètre.

Les puits ainsi définis et photofabriqués ont été analysés au profilomètre optique. La surface analysée mesure 36 mm × 20 mm (de telle sorte qu'elle comprenne l'intégralité du motif polymère) et la résolution en x et y correspond à 20 points/mm soit à 50 µm. Les profils de surface obtenus sont représentés ci-après :

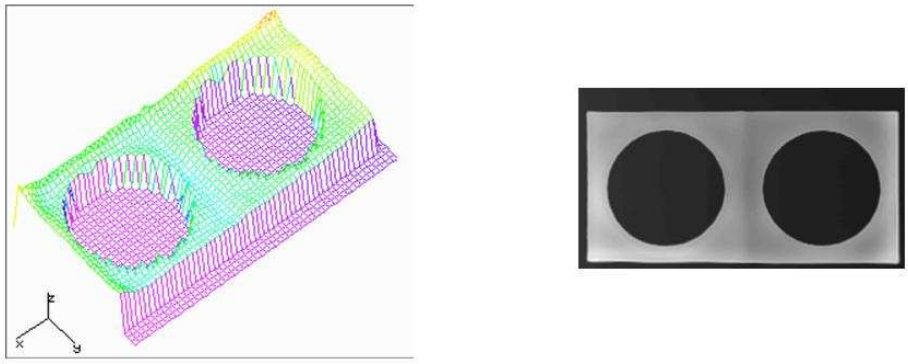


Figure 46 Profil de surface de 2 puits en polymère (d_{th} = 13 mm)
à gauche : vue 3D en perspective ; à droite : vue de dessus ; résolution : 50 µm

Sur l'image de gauche, le profil 3D de la surface est représenté en perspective et en dégradé de couleurs afin d'en faciliter l'interprétation. La palette de couleurs choisie correspond au spectre de la lumière visible, et l'altitude augmente de la même manière que les couleurs se succèdent lorsque la longueur d'onde croît, c'est-à-dire du violet vers le rouge.

Sur l'image de droite, le profil 3D de la surface est cette fois-ci représenté en vue de dessus et en niveaux de gris. La profondeur croît du blanc vers le noir. Ainsi, les puits figurent en noir et le polymère en gris clair.

Il apparaît dans un premier temps que les motifs, à savoir des puits circulaires, sont propres et correctement reproduits. Le polymère semble homogène et d'épaisseur relativement constante, peut-être plus épais aux arrêtes des carrés.
Nous allons pouvoir vérifier ces observations et les quantifier à partir des profils de lignes extraits de ces profils de surface. Nous avons récupéré le profil de la ligne passant par les centres des 2 puits (ligne AB), ainsi que celui d'une ligne tracée sur le polymère, dans le sens de la longueur, à l'extérieur des puits (ligne CD) :

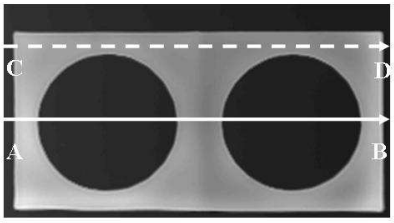


Figure 47 Profils de lignes : choix des lignes depuis le profil de surface

Remarque : Il est important de souligner que nous sommes limités dans le choix du tracé des lignes, qu'il s'agisse de profils extraits de profils de surfaces ou directement acquis. En effet, le placement de la lame à analyser sur le support du profilomètre reste imprécis, et il ne nous est pas permis de contrôler le déplacement de l'objectif, de telle sorte qu'il se fasse parallèlement à l'axe défini par les centres des puits. Dès lors, nous ne pouvons choisir en toute rigueur, une ligne qui passerait exactement par les centres des puits.

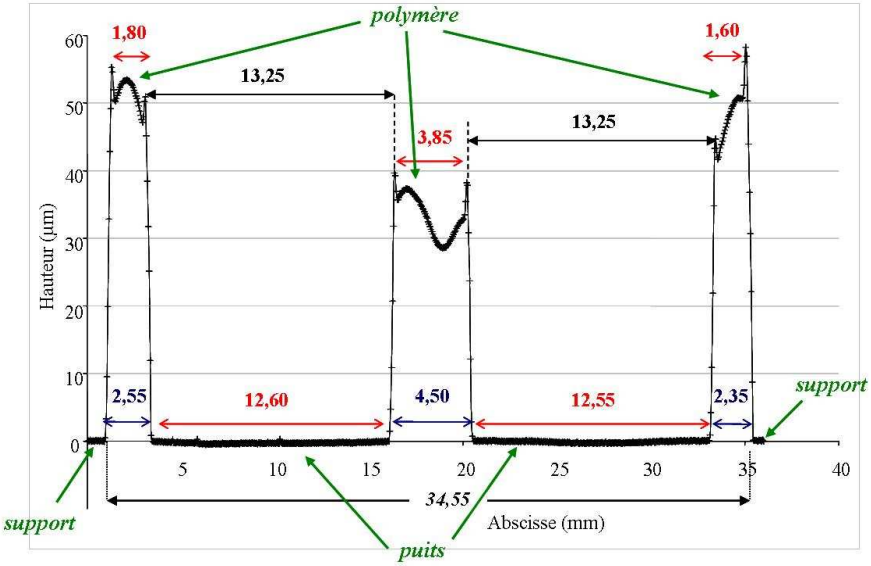


Figure 48 Profil de la ligne AB, résolution : 50 µm

Ce profil de ligne permet de rendre compte de l'épaisseur du polymère formé en fonction du déplacement latéral. L'origine de l'axe vertical qui définit la hauteur correspond au niveau du plan horizontal du support et sa valeur est égale à zéro.

On remarque tout d'abord, que nous sommes bien parvenus à fabriquer sur la lame deux puits délimités par des murs en polymère.

- ***Dimensions axiales des motifs***

Les puits formés ont un diamètre inférieur de 200 à 250 µm par rapport à la valeur annoncée (12,8 mm) et le polymère occupe une plus grande surface : au lieu de 2,20 mm, les segments extérieurs du polymère mesurent 2,55 et 2,35 mm, et les puits sont distants bords à bords de 4,50 mm contre 4,20 mm attendu. Ceci s'explique d'une part par le fait que le faisceau laser est gaussien, et que la valeur annoncée de 200 µm correspond au diamètre moyen mesuré. Or, la résine est particulièrement photosensible et il semble qu'il soit possible d'amorcer la polymérisation avec de faibles intensités lumineuses, soit lorsque le diamètre du faisceau est supérieur à 200 µm (cf. Figure 31, § C.I.2.1.). D'autre part, les radicaux diffusent dans le monomère, et la lumière dans le support en verre, d'où une propagation dans l'espace de la polymérisation.

- ***Verticalité des profils latéraux***

Si l'on prend garde aux échelles, les abscisses sont en millimètres et les ordonnées en micromètres, on s'aperçoit que les profils latéraux ne sont pas tout à fait verticaux et que le polymère est plus étroit au sommet qu'à la base. Ceci est dû au phénomène de retrait volumique, c'est-à-dire que le polymère (état solide) occupe un plus petit volume que le monomère (état liquide). La contraction se manifeste surtout sur la surface libre et moins en profondeur car les chaînes de polymère adhèrent au support. En effet, étant donné que la polymérisation est réalisée à même la lame, il y a peu de déformation au niveau de la surface de contact [André & Corbel, 1994]. Ceci permet d'évaluer le retrait linéaire de la résine: l'écart au niveau de la largeur du mur entre les deux puits, entre la surface libre et la surface de contact, conduit à une estimation du retrait linéaire à 14,4 %. Ceci est en accord avec les valeurs annoncées par Guerin et al. (1997) qui font mention d'un retrait de 7,5 % pour la SU8.

- ***Hauteur du polymère***

On remarque que le polymère est plus épais sur les bords qu'entre les deux puits. Nous supposons que cette surpolymérisation est due aux phénomènes de tension superficielle, qui conduisent au mouillage du polymère déjà formé par la résine. Des radicaux peuvent alors diffuser, du polymère vers la résine qui le mouille, et qui va polymériser à son tour. Ce phénomène ne se produirait qu'aux bords où le polymère est en contact avec un volume important de monomère liquide, à l'extérieur des motifs. En ce qui concerne le polymère formé entre les deux puits, il ne serait pas mouillé par le monomère, puisque celui-ci reste piégé à l'intérieur des puits.

- ***Pics de surpolymérisation***

On remarque enfin que les pourtours des puits et du polymère sont caractérisés par de petits pics qui traduisent une surpolymérisation. Le traçage du motif par le faisceau laser se fait en deux étapes : 1) traçage des contours du cercle puis du carré qui délimitent les zones à polymériser, 2) remplissage entre les contours suivant les directions x et y. Cela signifie que le laser effectue un passage supplémentaire sur les contours des motifs, d'où une surpolymérisation détectée en profilométrie optique.

Le profil représenté sur la figure 49 correspond au profil de la ligne tracée sur le polymère uniquement (ligne CD) :

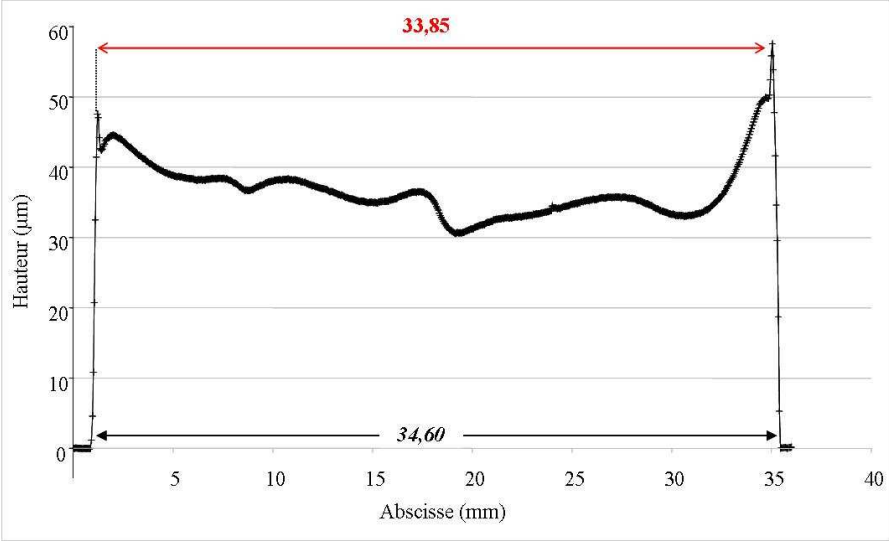


Figure 49 Profil de la ligne CD, résolution : 50 µm

On remarque que la surface du polymère n'est pas parfaitement plane. Néanmoins, abstraction faite des petits pics et des bourrelets de surpolymérisation aux bords, l'épaisseur du polymère reste à peu près constante (entre 31 et 38 µm) avec une variation qui peut être estimée à 18 %.

C.VI.1.2. Photofabrication de puits de diamètres variables

Nous avons dans un deuxième temps cherché à fabriquer des puits plus petits, en faisant régulièrement décroître leur diamètre jusqu'à atteindre une valeur minimum. Quoique la résine choisie permette de fabriquer des structures de l'ordre du micromètre, on est limité par la technique de photopolymérisation qui lui est ici associée (diamètre du faisceau laser) et dans l'étape de rinçage. En effet, il est difficile de nettoyer correctement l'intérieur des plus petits puits (1 mm), d'en enlever la résine liquide et le gel qui peut s'y être formé.

Nous avons conservé le motif de base, à savoir un cercle centré dans un carré. Les motifs sont dupliqués par translations successives selon x ; nous avons imposé à chaque duplication un diamètre de cercle plus petit, depuis 6 jusque 1 mm, tout en maintenant constant et égal à 2 mm l'intervalle (noté i) entre le cercle et le côté du carré dans lequel il est centré.

Nous avons analysé au profilomètre optique une surface mesurant 45 mm × 12 mm avec une résolution égale à 50 µm. Les profils obtenus sont présentés sur la figure 50.

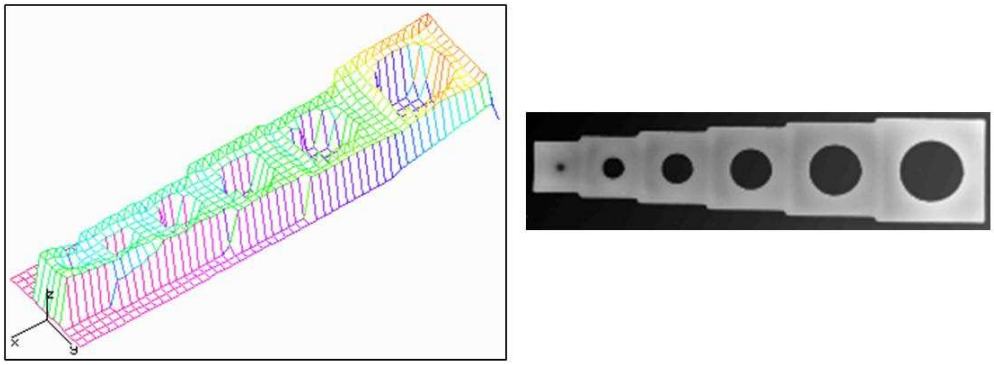


Figure 50 Profil de surface de 6 puits en polymère, d_{th} varie de 1 à 6 mm
à gauche : vue 3D en perspective ; à droite : vue de dessus ; résolution : 50 µm

Quelle que soit la taille du puits, les motifs paraissent être correctement reproduits. Les différences de couleurs (vue 3D en perspective) et de nuances de gris (vue de dessus) semblent indiquer que le polymère est plus épais autour du plus grand puits. L'étude des profils de lignes va nous permettre de confirmer ces résultats plutôt qualitatifs.

Nous avons extrait de ce profil de surface le profil de la ligne passant par les centres des 6 puits (Figure 51).

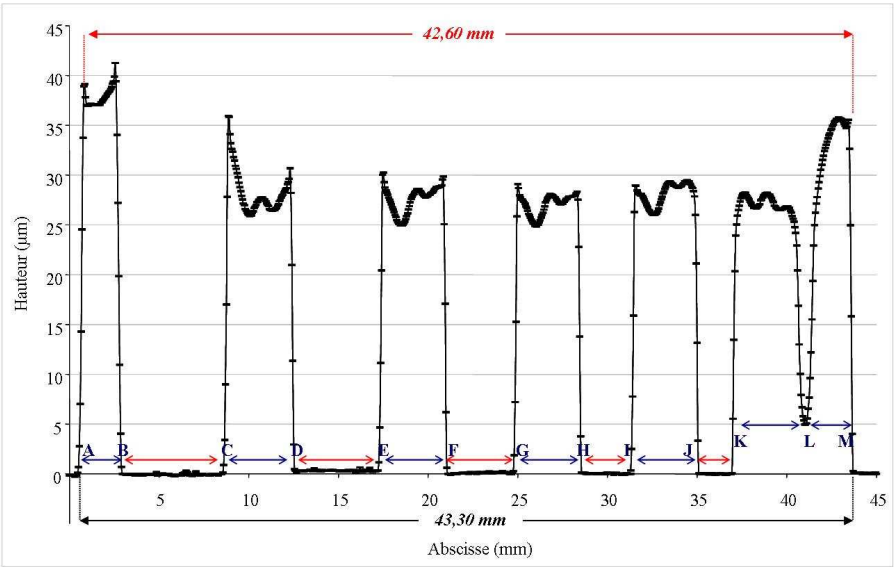


Figure 51 Profil de la ligne passant par le centres des puits ($1 < d_{th} < 6$ mm)
résolution : 50 µm

On remarque tout d'abord qu'il est possible de fabriquer des puits mesurant jusque 2 mm de diamètre théorique et présentant des profils latéraux satisfaisants. On observe cependant que la résine a polymérisé au fond du puits mesurant 1 mm de diamètre théorique. Nous constatons ainsi des limites à la méthode : en effet, il n'a pas été possible d'enlever la résine liquide de l'intérieur de ce puits lors de l'étape de révélation dans le PGMEA.

Entre les puits, les murs en polymère ont même hauteur et mesurent en moyenne entre 25 et 29 µm. Comme il a été observé précédemment, le polymère est plus épais sur les bords: sa hauteur mesure 36 µm du côté du petit carré et 42 µm à l'autre extrémité correspondant au plus grand motif. Nous retrouvons également les petits pics de surpolymérisation sur les pourtours des motifs.

La surface du polymère reste par ailleurs inégale : on observe notamment des bourrelets au milieu des segments de polymère, qui traduisent là encore une surpolymérisation. Ces bourrelets s'expliquent de la façon suivante : chaque fois qu'on duplique les motifs selon x, on réduit dans le même temps le diamètre des cercles d'un millimètre, et par là même d'autant la longueur des côtés des carrés dans lesquels ils sont centrés. Le programme associé au laser garde en mémoire le dernier motif sauvegardé (celui réduit d'un millimètre par rapport au précédent), et la distance de référence prise en compte pour le lasage est la distance centre à centre entre 2 motifs. D'où un chevauchement qui induit une surpolymérisation, comme illustré sur le schéma ci-après :

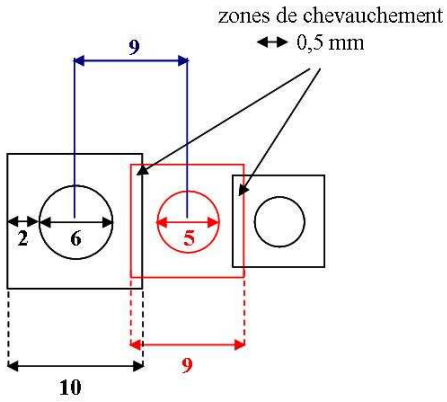


Figure 52 Zones de chevauchement lors de la photopolymérisation
Exemple des puits de 6 et 5 mm (d_{th})

Ceci a pour autre conséquence de réduire de 0,5 mm la distance entre deux puits, qui ne sont alors plus théoriquement distants bords à bords que de 3,5 mm.

Les dimensions théoriques et expérimentales des puits et des murs en polymère sont récapitulées dans le tableau 7. La distance théorique (d_{th}) correspond à la valeur définie dans le programme. Pour les murs en polymère, on soustrait la largeur correspondant à la zone de chevauchement. La *distance corrigée* prend en compte le diamètre du faisceau laser, soit $(d_{th}-d_f)$ pour les diamètres des puits, et $(i+d_f)$ entre les puits. Enfin, la *distance mesurée* correspond à la valeur mesurée expérimentalement pour h = 0, d'après le profil de ligne.

Segment	Distance corrigée (mm)	Distance mesurée (mm)	Ecart (%)
Puits			
BC	5,80	5,60	-3
DE	4,80	4,65	-3
FG	3,80	3,65	-4
HI	2,80	2,75	-2
JK	*1,80*	*1,85*	*+3*
Murs en polymère			
AB	2,20	2,50	+14
CD	3,70	4,10	+11
EF	3,70	3,90	+5
GH	3,70	3,80	+3
IJ	3,70	3,80	+3
KL	*3,70*	*4,05*	*+9*
LM	*2,20*	*2,75*	*+25*
Motif global			
AM	42,70	43,30	+1

Tableau 7 Dimensions théoriques et expérimentales des motifs en polymère

L'écart particulièrement important entre les valeurs théoriques (corrigées du diamètre de faisceau) et celles mesurées dans le cas des segments KL et LM, s'explique par le fait que la résine a polymérisé à l'intérieur du puits mesurant 1 mm de diamètre (d_{th}).

On remarque plus généralement que les valeurs théoriques et les mesures expérimentales ne coïncident pas : les puits sont en réalité plus petits et les murs en polymère couvrent une plus grande surface. Ceci est vrai partout, sauf dans le cas du puits JK où la valeur mesurée est alors supérieure à la distance théorique corrigée. Cela signifie que cette dernière a été sous-évaluée, c'est-à-dire que le diamètre du faisceau est en réalité plus petit et mesure au maximum 150 µm. Ceci est tout à fait possible, puisque le faisceau laser n'est pas stable et que son diamètre oscille constamment entre 120 et 250 µm. La valeur annoncée de 200 µm correspond à une valeur moyenne mesurée. On peut également imputer ceci à la résolution : rappelons que les mesures sont enregistrées tous les 50 µm.

C.VI.1.3. Matrices de puits de diamètres constants

Nous avons ensuite fabriqué des matrices de puits de diamètres constants. Pour ce faire, nous avons dupliqué plusieurs fois le même motif selon x et y, et ce, dans les deux sens.

Les caractéristiques géométriques de ces matrices ainsi que les paramètres d'analyse des surfaces au profilomètre sont regroupés dans le tableau 8.

	Matrice (3×7) puits	Matrice (2×7) puits
Diamètre théorique d_{th} (mm)	5,00	2,00
Intervalle théorique i (mm)	1,50	2,00
Analyse au profilomètre		
Surface analysée (mm × mm)	50 × 24	46 × 16
Résolution (µm)	50	50

Tableau 8 Dimensions des matrices et paramètres de l'analyse au profilomètre

Les profils de surface sont présentés ci-après :

- *Matrice (3×7) puits :*

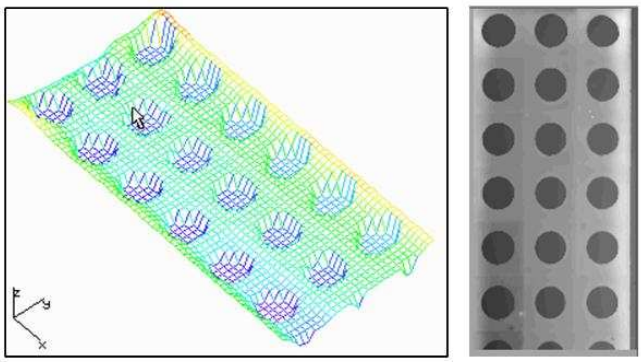


Figure 53 Profil de surface de la matrice (3×7) puits
à gauche : vue 3D en perspective ; à droite : vue de dessus ; résolution : 50 µm

Les différences de couleurs indiquent là encore une surépaisseur le long des bords du polymère. Les puits formés ne sont pas parfaitement circulaires mais les motifs sont propres.

- *Matrice (2×7) puits :*

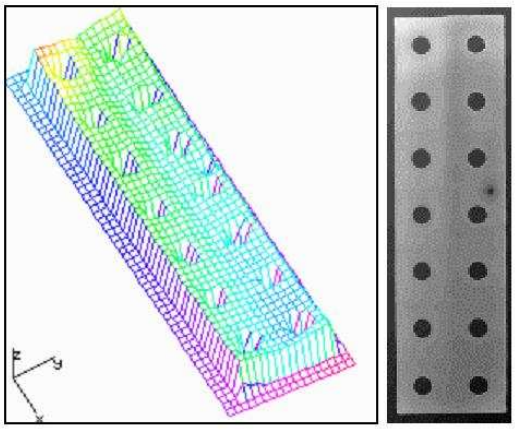


Figure 54 Profil de surface de la matrice (2×7) puits
à gauche : vue 3D en perspective, à droite : vue de dessus ; résolution : 50 µm

Nous avons extrait de ce profil de surface 4 profils de lignes (Figure 55) :

- les lignes L_1 et L_2 passent par les centres des puits (une ligne pour chaque ligne de la matrice),
- les lignes L_3 et L_4 sont tracées sur le polymère à l'extérieur des puits.

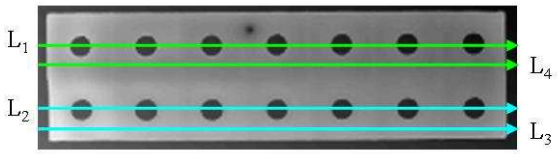


Figure 55 Choix des lignes depuis le profil de surface de la matrice (2×7) puits

Nous avons superposé sur un premier graphique les profils des deux lignes passant par les centres des puits (Figure 56) et sur un deuxième graphique les profils des lignes tracées sur le polymère (Figure 58).

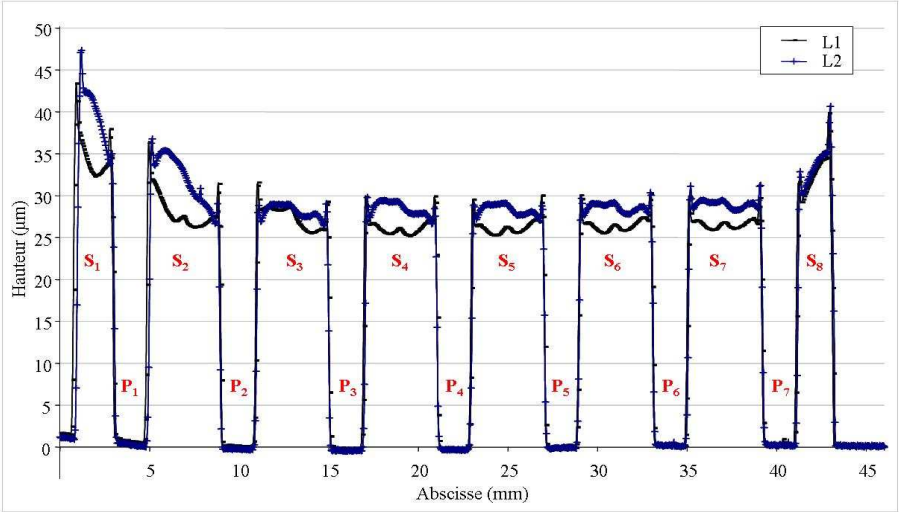


Figure 56 Profil des lignes L_1 et L_2 passant par les centres des puits, résolution : 50 µm

On retrouve les bourrelets et les pics de surpolymérisation déjà observés et justifiés au paragraphe C.VI.1.1. Loin des bords, la surface du polymère (segments S_3 à S_7) reste homogène selon x. Le polymère est cependant globalement plus épais en L_2 qu'en L_1 : 28,5 µm en moyenne pour les segments S_3 à S_7 pour la ligne L_2, et 25,5 µm en moyenne pour la ligne L_1.

Les dimensions selon x des puits (P_i) et des murs en polymère (S_i) pour h = 0 sont regroupées dans le tableau 9:

Segment	Distance corrigée (mm)	Distance mesurée (mm)	
		L_1	L_2
Puits P_i			
P_1	1,80	1,55	1,60
P_2	1,80	1,60	1,70
P_3	1,80	1,65	1,70
P_4	1,80	1,55	1,60
P_5	1,80	1,55	1,60
P_6	1,80	1,50	1,65
P_7	1,80	1,60	1,60
Murs en polymère S_i			
S_1	2,20	2,50	2,40
S_2	4,20	4,45	4,25
S_3	4,20	4,45	4,40
S_4	4,20	4,40	4,35
S_5	4,20	4,45	4,40
S_6	4,20	4,55	4,45
S_7	4,20	4,55	4,50
S_8	2,20	2,35	2,30

Tableau 9 Matrice (2×7) puits
Dimensions théoriques et expérimentales des motifs en polymère

Il apparaît là encore que les valeurs théoriques (corrigées) et les mesures expérimentales diffèrent, et ce plus ou moins en fonction de la ligne considérée. Pour chaque segment, cet écart s'explique de la même façon qu'au paragraphe C.VI.1.1. (faisceau laser gaussien, propagation dans l'espace de la polymérisation, etc.).

Si on compare les résultats obtenus pour chacune des deux lignes, on constate que non seulement le polymère est plus épais en L_2 qu'en L_1, mais que l'écart est aussi plus faible entre les dimensions théoriques corrigées et les valeurs mesurées. Or, les puits ont été polymérisés par duplications successives, de P_1 à P_7 en commençant par la rangée inférieure (L_2), puis de P_7 à P_1 pour la rangée supérieure (L_1), comme schématisé ci dessous par les petites flèches blanches dessinées sur le profil de surface :

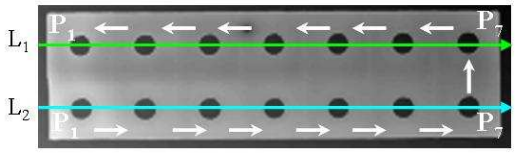


Figure 57 Ordre de la polymérisation des puits

Le premier motif est tracé autour du point de focalisation. A chaque duplication, on s'écarte de plus en plus de l'axe optique vertical défini par le faisceau laser défléchi par les miroirs à t = 0 ; la forme du spot évolue vers une ellipse, qui devient de plus en plus grande à mesure qu'on s'éloigne du point de focalisation. Le faisceau lumineux a son intensité alors répartie sur une plus grande surface. Ceci permet d'expliquer pourquoi dans le cas de la ligne L_2, le polymère est légèrement plus épais et les résultats plus précis par rapport à la ligne L_1.

Ces différences d'épaisseur sont effectivement accentuées selon y, comme on peut le remarquer sur la figure 58 où sont superposés les profils des lignes L_3 et L_4.

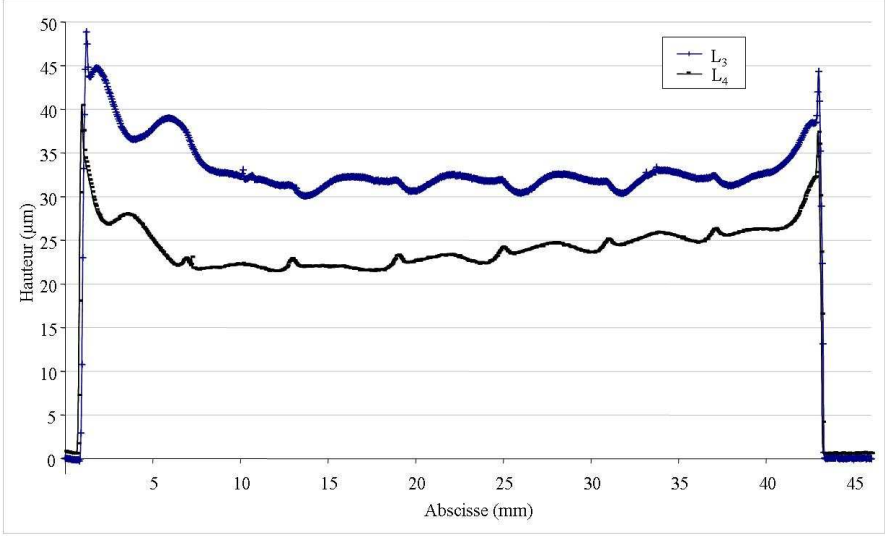


Figure 58 Profil des lignes L_3 et L_4, résolution : 50 µm

Les creux et les petits bourrelets observés respectivement sur L_3 et L_4 indiquent que ces lignes ont été tracées tout contre les puits (L_4), voire légèrement sur les puits (L_3). Abstraction faite de ceci et des effets de bords, l'épaisseur du polymère est relativement constante selon x : 32 µm en moyenne pour L_3 et 24 µm pour L_4.

C.VI.1.4. Précision de la photopolymérisation

Nous avons fabriqué une grille en polymère en appliquant le protocole récapitulé au paragraphe C.IV.4. : cette grille mesure 45 mm × 18 mm, et nous avons effectué un remplissage dans les deux directions orthogonales avec un pas égal à 1 mm.
Nous avons enregistré le profil d'une ligne tracée dans le sens de la longueur avec une résolution égale à 50 µm (Figure 59).

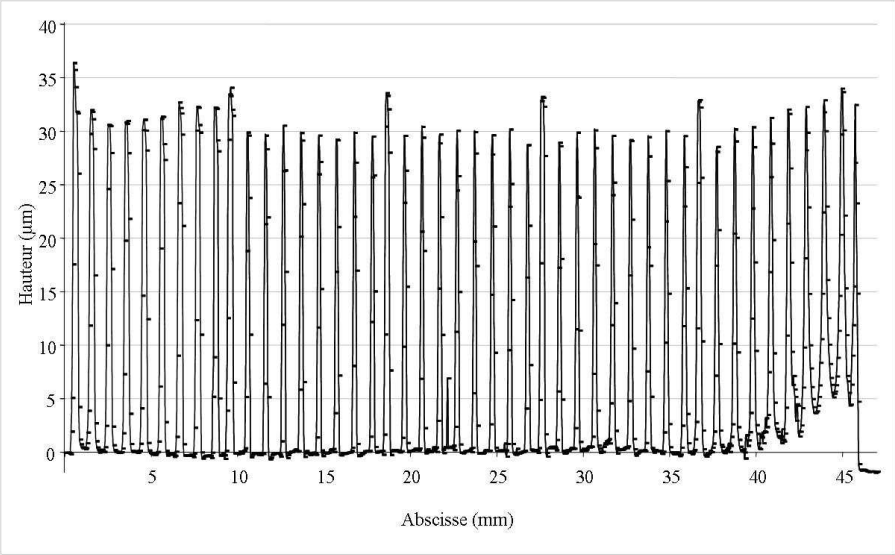


Figure 59 Profil de ligne de la grille réalisée avec un intervalle de remplissage égal à 1 mm résolution : 50 µm

On remarque tout d'abord que l'épaisseur du polymère est pratiquement constante et égale à 30 µm sur toute la longueur. Ces résultats sont par ailleurs très encourageants, puisque nous avons ainsi pu fabriquer indirectement des petits puits carrés (dimensions théoriques : 1 mm × 1 mm) délimités par des murs en polymère très fins. On remarque qu'entre 40 et 45 mm, la résine a polymérisé à l'intérieur de la grille.

Pour pouvoir correctement analyser ces résultats à l'échelle des puits, nous avons réalisé un zoom de la figure 59 entre 10 et 20 mm :

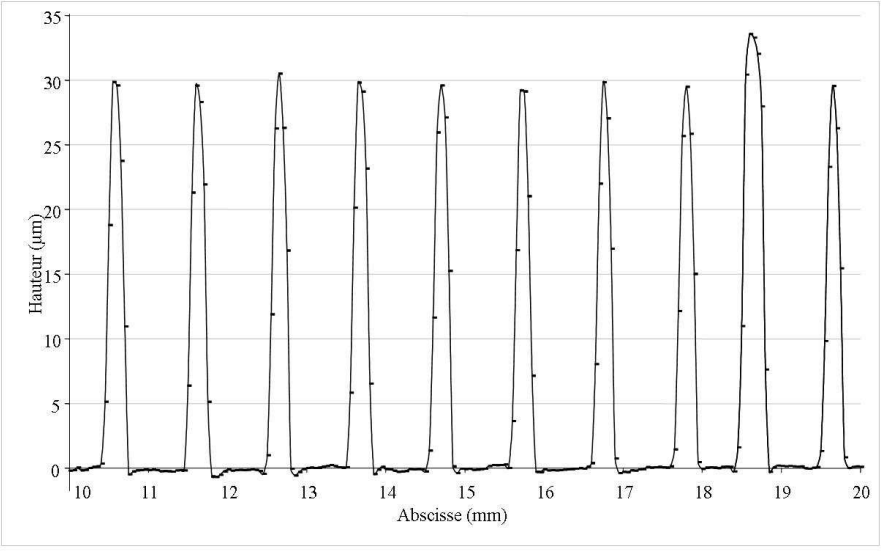


Figure 60 Profil de la ligne entre 10 et 20 mm ; résolution 50 : µm

Pour h = 0, les puits mesurent en moyenne 0,65 mm de large et les murs 0,35 mm ; cette dernière valeur correspond à la largeur moyenne d'un trait photopolymérisé. Etant donné que le diamètre du faisceau laser mesure environ 200 µm, il y a bien propagation de la polymérisation en x et y, au-delà de la surface directement illuminée.

C.VI.2. Plots en polymère

Nous avons appliqué le même protocole que dans le cas de la fabrication des puits en polymère, à la différence près que nous avons cette fois ci effectué le remplissage inverse : le motif de base reste le même, à savoir un cercle centré dans un carré, et on remplit l'intérieur du disque par balayage laser dans les deux directions orthogonales, avec un pas toujours égal à 0,1 mm.

C.VI.2.1. Photofabrication de deux plots

Pour étudier si l'on peut transposer aux plots les résultats obtenus dans le cas des puits en polymère, à savoir des motifs correctement reproduits (forme et dimensions) et qui présentent des profils latéraux satisfaisants, deux plots de grandes dimensions ont dans un premier temps été photofabriqués.

Leurs caractéristiques géométriques sont les suivantes : ils mesurent 13 mm de diamètre (d_{th}) et sont virtuellement centrés dans un carré mesurant 19 mm de côté (soit théoriquement distants bords à bords de 6 mm).

La surface analysée au profilomètre optique mesure 35 mm × 16 mm et la résolution en x et y correspond à 10 points/mm soit 100 µm. Nous avons ici diminué la résolution afin de réduire les durées d'analyses, généralement très longues.

Les profils de surface sont présentés sur la figure 61.

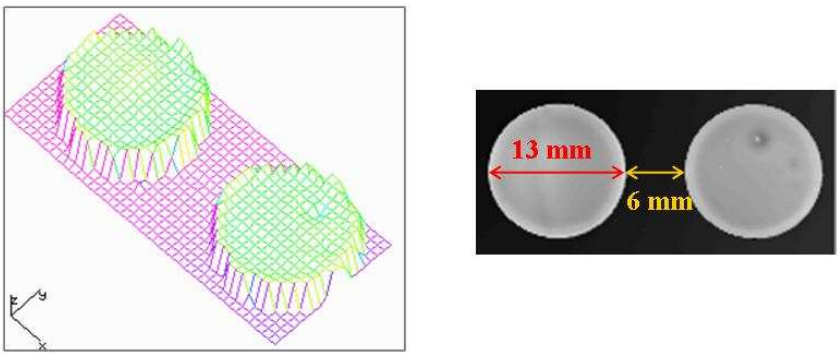


Figure 61 Profil de surface de 2 plots en polymère - à gauche : vue 3D en perspective à droite : vue de dessus avec les cotes théoriques de fabrication ; résolution : 100 µm

On remarque que les motifs, à savoir des disques pleins, sont correctement reproduits.

Nous avons extrait de ce profil de surface le profil de la ligne passant par les centres des plots :

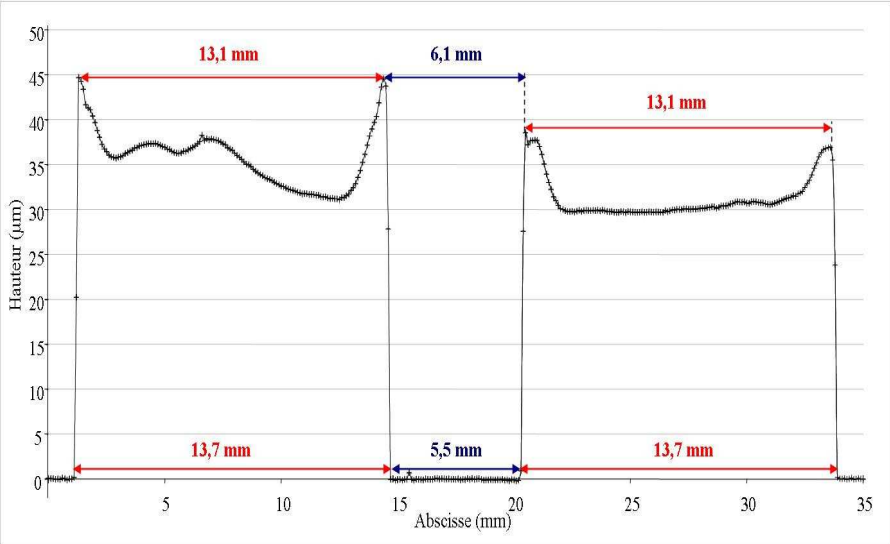


Figure 62 Profil de la ligne passant par les centres des 2 plots ; résolution : 100 µm

On retrouve les mêmes caractéristiques que dans le cas des puits : surépaisseur et petits pics de surpolymérisation sur les bords, phénomène de retrait volumique qui se traduit par des profils latéraux non parfaitement verticaux.
L'écart est d'environ 4 % entre les valeurs théoriques corrigées et les mesures expérimentales ; il peut s'expliquer de la façon suivante :

- D'une part, l'erreur relative induite sur les mesures du fait d'une moins bonne résolution : en effet, nous sommes passé d'une résolution de 50 µm dans le cas des puits, à 100 µm pour l'analyse des deux plots. De ce fait, on accroît l'incertitude portant sur chacun des deux points entre lesquels la distance est mesurée. On peut ainsi commettre une erreur supérieure de 100 µm par rapport au cas des puits (50 µm par rapport à chaque point).

- D'autre part, étant donné que nous ne mesurons pas systématiquement avant chaque expérience le diamètre du faisceau laser au point de focalisation, les dimensions théoriques *corrigées* restent définies de façon imprécise.

Ces incertitudes nous montrent les limites de la technique employée avec notamment l'imprécision portant sur le diamètre du faisceau. Nous allons à présent regarder quelle est la résolution en fonction de la taille des plots, la limite basse théorique étant directement liée au diamètre du faisceau.

C.VI.2.2. Photofabrication de plots de diamètres variables

Dans cette optique, nous avons cherché à fabriquer des plots de plus en plus petits. Nous avons ainsi polymérisé deux fois de suite sur une même lame, la même série de 6 plots. La méthode consiste à dupliquer selon x le même motif, à savoir un disque plein centré dans un carré. Nous avons fait régulièrement décroître le diamètre des disques depuis 6 mm jusque 1 mm (d_{th}). L'intervalle *i* entre le disque et le côté du carré est maintenu constant et égal à 1 mm. Les plots devraient être alors théoriquement distants bords à bords de 2 mm, mais du fait de la réduction d'échelle, les motifs vont se chevaucher sur 0,5 mm.

La surface analysée au profilomètre mesure 50 mm × 7,6 mm. Rappelons que nous sommes limités à 50 mm en x et y, pour l'analyse des profils de surface comme de ligne ; nous n'allons donc pas pouvoir analyser en une seule fois tous les plots qui sont distribués sur une distance de 60,5 mm. La résolution en x et y est égale à 50 µm.

Les profils de surface sont présentés sur la figure 63.

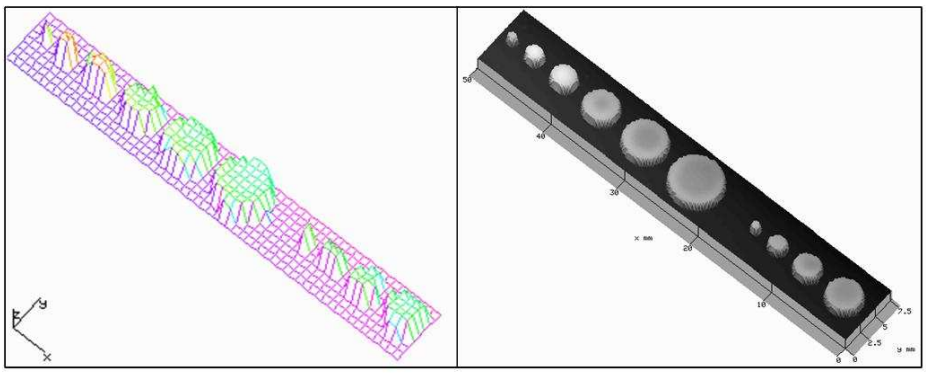


Figure 63 Profil de surface des plots en polymère, $1 < d_{th} < 6$ mm
Vues 3D en perspective : en couleurs (à gauche), et en nuances de gris (à droite)
résolution : 50 µm

On remarque tout d'abord que nous pouvons fabriquer des plots mesurant jusqu'à 1 mm de diamètre théorique, ce qui constitue un réel avantage par rapport à la méthode de localisation à l'intérieur des puits en polymère.
Par ailleurs, les trois plots les plus à gauche sur chaque vue, semblent plus épais.

Le profil présenté ci-après a été extrait de ce profil de surface, et correspond au profil de la ligne passant par les centres des plots ; ces derniers sont notés Pl_i sur la figure 64 :

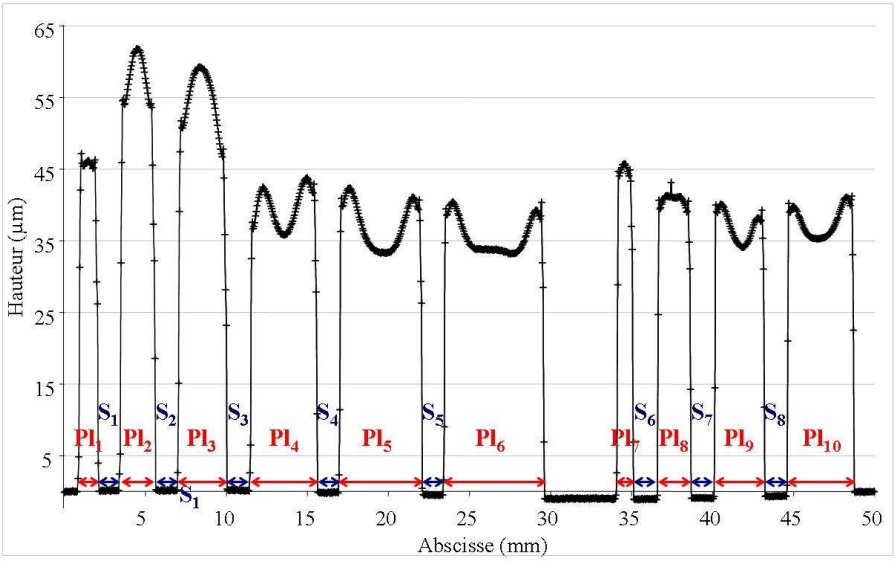


Figure 64 Profil de la ligne passant par les centres des plots, résolution : 50 µm

Ces résultats confirment les observations faites précédemment : les 3 premiers plots (les plus à gauche sur la figure) plus le plot noté Pl_7, sont plus épais.

Nous avons regroupé dans le tableau 10, les dimensions suivant x des différents segments pour h = 0 µm.

Segment	Distance corrigée $d_{th}+d_f$ (mm)	Distance mesurée (mm)	Ecart (%)
Plots en polymère Pl_i			
Pl_1	1,20	1,35	**+12,5**
Pl_2	2,20	2,35	**+7**
Pl_3	3,20	*3,15*	***-1,5***
Pl_4	4,20	4,30	**+2**
Pl_5	5,20	5,25	**+1**
Pl_6	6,20	6,30	**+2**
Pl_7	1,20	*1,15*	***-4***
Pl_8	2,20	*2,15*	***-2***
Pl_9	3,20	*3,20*	***0***
Pl_{10}	4,20	*4,20*	***0***
Intervalles entre les plots S_i			
S_1	1,30	1,20	**-8**
S_2	1,30	1,25	**-4**
S_3	1,30	*1,30*	***0***
S_4	1,30	1,20	**-8**
S_5	1,30	1,20	**-8**
S_6	1,30	*1,45*	***+11,5***
S_7	1,30	*1,35*	***+4***
S_8	1,30	*1,30*	***0***

Tableau 10 Plots en polymère
Dimensions théoriques corrigées et expérimentales pour h = 0 µm

Les valeurs expérimentales sont relativement proches des valeurs théoriques. Les résultats obtenus dans le cas des plots Pl_7 à Pl_{10} peuvent paraître surprenants : en effet, la distance mesurée est alors plus petite que la valeur théorique corrigée, tandis que les intervalles entre ces plots sont plus grands. Ceci doit être dû au fait que la ligne à partir de laquelle ce profil a été réalisé ne passe pas exactement par les centres des plots.

Le plus petit plot que nous avons ainsi fabriqué mesure donc au maximum 1,35 mm.

C.VI.3. Conclusion concernant la photofabrication

Nous avons mis au point un protocole de fabrication à même les lames S de puits ou de plots en polymère, avec pour objectif d'isoler sur la surface du support certains sites réactionnels - NH_2, à l'intérieur de ces puits, ou à la place de ces plots. Le principe de la méthode consiste à polymériser localement une résine photosensible en utilisant une machine de stéréolithographie. Cette technologie nous permet de tracer une matrice de disques, creux (puits) ou pleins (plots), dans le plan (x,y) avec une épaisseur contrôlée de la monocouche formée.

Nous avons observé un écart entre les dimensions dans le plan (x,y) des motifs ainsi réalisés, par rapport aux consignes théoriques. Par ailleurs, la surface du polymère est quelque peu inhomogène : les bords de la matrice et les contours des motifs sont notamment plus épais. Ces imprécisions sont principalement liées au système optique du montage de stéréolithographie. Elles sont d'autant plus importantes que la taille de la matrice fabriquée est grande et que le tracé s'écarte de l'axe optique vertical défini par le faisceau laser lorsqu'il est au point de focalisation. Cependant, étant donné la finalité de la fabrication des puits ou des plots en polymère, c'est-à-dire réaliser des greffages covalents bien localisés, ce qui importe c'est que nous soyons parvenu à isoler des sites réactionnels à l'intérieur d'un motif circulaire, dont le diamètre peut mesurer jusque 2 (puits) voire même 1 mm (plots), et dont la hauteur est comprise entre 30 et 50 µm.

En vue d'améliorer la précision géométrique des motifs fabriqués, l'utilisation d'un système de masques optiques de pixels au lieu d'un traçage vectoriel est actuellement en cours d'étude au DCPR.

Il convient enfin de vérifier les points suivants :

- ✓ le polymère est stable chimiquement, et notamment dans les solvants utilisés pour réaliser les greffages,
- ✓ le polymère est étanche,
- ✓ le polymère peut être séparé du support,
- ✓ les sites réactionnels protégés par le polymère ont été préservés.

C.VII. Stabilité du polymère dans différents solvants

Nous avons auparavant étudié différentes résines photosensibles : 4 autres résines spécifiques à la stéréolithographie, telles que la SI 30, la SI 40, la ND*Cure* 400 ND et la RP*Cure* 200 ont été testées en plus de la SU-8 5.

Dans tous les cas, nous sommes parvenus à fabriquer des motifs en polymère sur les lames silanisées ; cependant, les résultats obtenus à partir des 4 résines de stéréolithographie étaient moins précis par rapport à ceux obtenus avec la SU-8 5 et les polymères formés à partir de ces résines présentaient une très mauvaise adhésion aux lames S. En effet, une fois les plaques immergées dans différents solvants organiques, ceux-là même que nous avons testés avec succès avec la SU-8 5, tels que l'éthanol absolu, le dichlorométhane ou encore l'acétone, les polymères se décollaient des lames après seulement quelques heures.

Voilà pourquoi, par élimination d'une part, et parce qu'elle est particulièrement adaptée pour la microfabrication d'autre part, nous avons choisi d'utiliser la SU-8 5 pour réaliser des motifs en polymère sur les supports silanisés.

Afin d'étudier la stabilité chimique du polymère formé à partir de cette résine, les plaques sur lesquelles les polymérisations ont été directement réalisées ont été immergées plusieurs heures dans différents solvants, sous agitation magnétique et à température ambiante. Nous avons testé les solvants utilisés pour réaliser les greffages, ainsi que différents solvants organiques utilisés notamment au cours des étapes de rinçage. Nous avons récapitulé dans le tableau présenté ci-dessous les résultats obtenus au cours de cette étude :

Solvants	Durée d'immersion
Solvants de rinçage	
Ethanol absolu	65 h
Dichlorométhane	49 h
Diméthylformamide	*20 min*
Milieux de greffage	
DMF/tampon bicarbonate pH 8,5 (10/90, v/v)	5 j
AcOH/EtOH (25/75, v/v)	2 j
Autres solvants	
Acétone	48 h
DMF/tampon bicarbonate pH 8,5 (25/75, v/v)	24 h
PGMEA	51 h

Tableau 11 Etude de l'adhésion du polymère avec le support dans différents solvants

Après immersion des plaques plusieurs heures dans les différents solvants testés, le polymère reste accroché sur les supports, sauf dans le cas du diméthylformamide. En effet, au bout d'une vingtaine de minutes, le polymère se décolle en bloc du support.

Ce résultat est très important : sans cela, nous n'aurions pas eu d'autres choix que de localiser les greffages à l'intérieur des puits ; ce résultat sous-tend en effet la méthode de localisation par fabrication de plots en polymère, dont le rôle est de protéger physiquement les sites réactionnels, pourvu qu'on puisse à terme les séparer du support.

Les différents points qu'il reste à vérifier pour pouvoir valider ces méthodes vont être étudiés dans la prochaine partie.

4ème partie : Partie D

D. LOCALISATION DES GREFFAGES COVALENTS

Introduction

Nous avons en première partie vérifié qu'il était possible de réaliser des greffages covalents sur les lames commerciales silanisées -NH_2. Nous avons étudié différents traceurs fluorescents, à savoir deux composés acide ainsi qu'un dérivé coumarine possédant une fonction aldéhyde, dont nous avons déterminé les caractéristiques spectrales. Nous avons ensuite développé deux méthodes de localisation basées sur la photofabrication à même les lames S de matrices en polymère, avec pour objectif le greffage localisé de molécules d'intérêt biologique sur les supports. La première méthode a pour principe la localisation de sites réactionnels sur une seule face du support, à l'intérieur de puits physiques en polymère : dans ce cas, les greffages localisés vont être réalisés par des dépôts à l'intérieur de ces puits, voire par mouillage de la surface polymérisée avec les solutions de greffages. La seconde méthode repose sur la protection physique par des plots en polymère des sites réactionnels où seront réalisés les greffages, couplée à une protection chimique de tous les autres sites –NH_2 présents sur la surface du support ; pourvu que toutes les étapes en amont puissent être validées, les greffages pourront être réalisés à l'emplacement des plots par dépôt, mouillage, ou immersion des plaques dans les solutions.

Nous allons à présent combiner ces deux études et procéder au greffage covalent et localisé des traceurs fluorescents. Nous avons retenu les deux dérivés acides, car ils présentent des caractéristiques en fluorescence très distinctes et que leur greffage est réalisé dans les mêmes conditions opératoires, par ailleurs appropriées pour la réalisation de dépôts (solvant aqueux) sur les supports (surface hydrophobe). Les résultats de ces greffages vont être analysés par spectrofluorimétrie et par microscopie à fluorescence.

D.I. Localisation des greffages

Nous avons fabriqué des matrices de puits en polymère à l'intérieur desquels nous nous proposons de greffer les traceurs fluorescents, ainsi que des matrices de plots, à la place desquels nous espérons pouvoir réaliser les greffages, et ce de façon parfaitement localisée.

D.I.1. Principe des deux méthodes de localisation des greffages

D.I.1.1. Localisation des greffages à l'intérieur de puits en polymère

Etant donné que les supports sur lesquels les polymérisations ont été réalisées, à savoir les lames S, sont fonctionnalisés sur les deux faces, nous ne pouvons procéder aux greffages en immergeant directement les plaques dans les différentes solutions. Nous avons alors effectué des dépôts à l'aide d'une micropipette, à l'intérieur de chaque puits, ou bien nous avons procédé par mouillage de la surface polymérisée avec les solutions de greffage (Figure 65) : pour ce faire, nous avons disposé les lames sur des verres de montre (8 cm de diamètre) que nous avons remplis avec précaution, afin que la solution de greffage ne vienne mouiller uniquement que la surface polymérisée de la lame, sans s'étaler sur l'autre face, à l'air libre. Dans ce cas précis, la réaction de greffage est conduite sous agitation magnétique, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

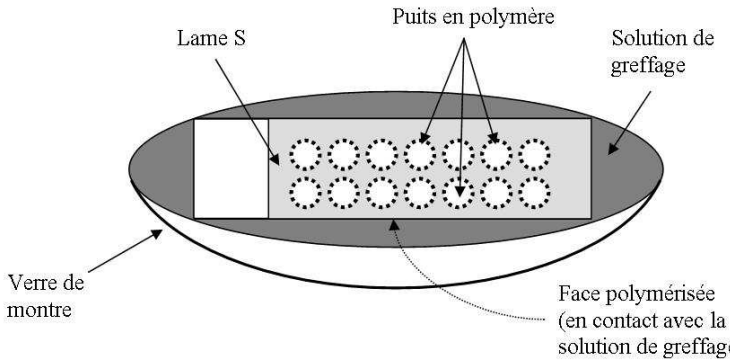


Figure 65 Greffage par mouillage à l'intérieur des puits en polymère

Après greffage, les plaques sont immergées plusieurs heures dans différents solvants (cf. protocoles décrivant le greffage covalent des traceurs fluorescents acides sur les lames S, partie B, § B.V.4.2. et B.V.5.3.).

Suivant la technique de détection employée, nous avons alors choisi d'enlever ou non le polymère, en immergeant les lames quelques minutes dans du DMF, sous agitation magnétique.

D.I.1.2. Localisation des greffages à la place de plots en polymère

Le principe de cette méthode de localisation repose sur la protection physique de certains sites réactionnels par des plots en polymère. Pour ce faire, on procède par étapes (Figure 66) : dans un premier temps, on protège chimiquement toutes les fonctions amines libres, c'est-à-dire toutes celles qui ne sont pas recouvertes par le polymère (1), puis les plots sont décollés du support par immersion dans du DMF (2), enfin, on procède au greffage localisé à la place des plots, soit en immergeant les lames dans les différentes solutions, soit par mouillage de la surface anciennement polymérisée (3).

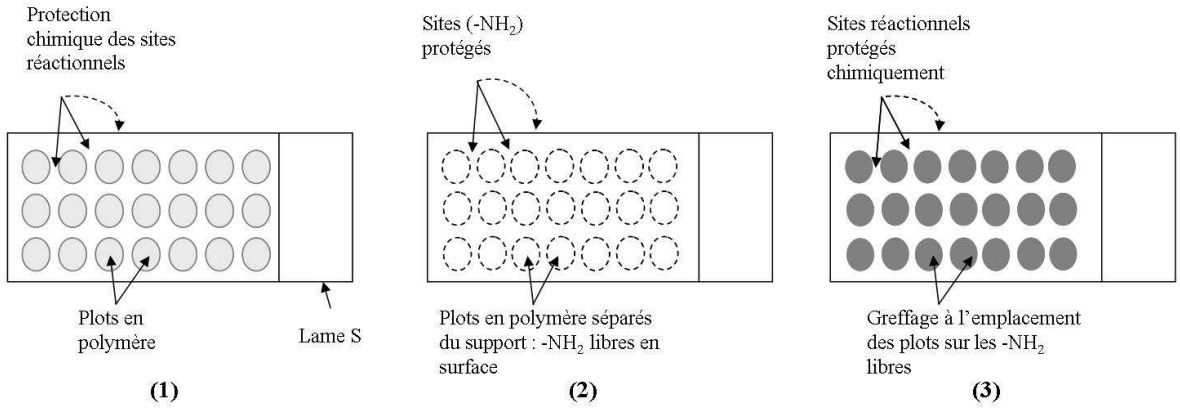


Figure 66 Principe de la méthode de localisation basée sur la fabrication de plots en polymère

Pour réaliser la protection chimique de toutes les fonctions $-NH_2$ extérieures aux plots, nous nous proposons d'y greffer une chaîne carbonée via une liaison amide : nous avons choisi d'utiliser l'acide dodécanoïque, activé par le N-hydroxysuccinimide.

En tout premier lieu, il a fallu s'assurer que le polymère était bien étanche : en effet, pour réaliser cette protection chimique, nous allons devoir immerger entièrement les plaques polymérisées dans cette solution. Par ailleurs, concernant les greffages à l'intérieur des puits en polymère, et notamment si on procède par mouillage, il est indispensable que le polymère soit étanche, afin que les greffages restent parfaitement localisés à l'intérieur des puits.

Enfin, il convient de vérifier que les groupements amino protégés par le polymère ont été, sinon tous, du moins en majorité, préservés, c'est-à-dire vérifier qu'il est possible de réaliser des greffages covalents localisés à cet endroit, une fois le polymère séparé du support.

D.I.2. Détection des greffages localisés – Utilisation de la microscopie à fluorescence

Nous avons choisi comme méthode de détection la spectrofluorimétrie, mais aussi la microscopie à fluorescence, notamment pour détecter les greffages localisés sur des surfaces circulaires de diamètre inférieur à 12 mm : en effet, avec le ***Spex FluoroLog*-3**, en sortie du monochromateur d'excitation, le faisceau lumineux qui vient exciter l'échantillon est de forme rectangulaire et mesure environ 10 mm de haut. Ainsi, dans le cas de motifs en polymère (puits ou plots) plus petits, le faisceau incident déborde de la surface à analyser (Figure 67), prenant aussi en compte la fluorescence du polymère, par ailleurs très importante, ou celle du support, dans le cas où le polymère aurait été enlevé ; dans les deux cas, l'analyse des greffages localisés est faussée (surestimée).

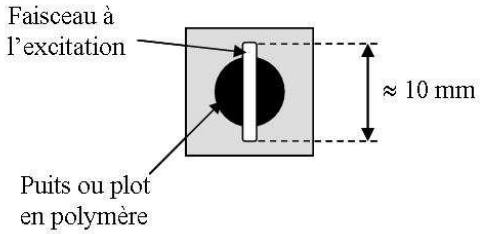


Figure 67 Taille du faisceau en sortie du monochromateur d'excitation (***Spex FluoroLog-3***)

Par ailleurs, dans le cas où le diamètre des surfaces à analyser est supérieur à la taille du faisceau excitateur, il n'est pas possible de prendre plus de 3 ou 4 mesures à l'intérieur des puits/plots, ou de réaliser un profil de la fluorescence observée.

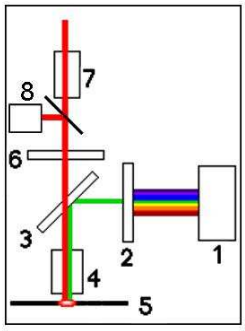
La microscopie à fluorescence :

Cette technique permet de visualiser sur une surface l'émission de fluorescence de molécules excitées à une longueur d'onde appropriée. La microscopie à fluorescence est très utilisée en biologie, et notamment dans le domaine de la biologie cellulaire : elle permet par exemple de localiser au sein des cellules certaines protéines marquées avec une espèce fluorescente.

La source lumineuse est généralement constituée d'une lampe à arc à vapeur de mercure ou de xénon qui émet dans l'UV-visible. Un microscope à fluorescence est généralement équipé de plusieurs jeux de filtres, comprenant chacun un filtre pour l'excitation et un filtre pour l'émission. Un miroir dichroïque permet de séparer la fluorescence émise du faisceau excitateur, focalisé par un objectif sur l'échantillon. La fluorescence est directement observée à l'œil ou est enregistrée avec un appareil photographique ou une caméra CCD (charge-coupled-device).

L'appareil que nous avons utilisé est un microscope en épifluorescence (c'est-à-dire que l'objectif sert à la fois à exciter l'échantillon et à collecter la fluorescence) de type ***ZEISS Axiotech***. Il est équipé d'une lampe halogène et d'une lampe à vapeur de mercure et est surmonté d'une caméra CCD. La sensibilité de cette dernière s'étant révélée beaucoup trop faible, nous l'avons remplacée par un photomultiplicateur IP28 (Hamamatsu) que nous avons connecté à un ampèremètre pour pouvoir quantifier la fluorescence émise ; l'intensité peut être lue sur différents calibres (1 à 4). Le faisceau excitateur est diaphragmé afin d'illuminer une petite partie de la surface à analyser. Pour mesurer la fluorescence à l'intérieur d'une zone supposée homogène, une moyenne est réalisée sur plusieurs points choisis par l'expérimentateur pour éviter de prendre en compte des motifs fluorescents ne correspondant pas à des greffages (agrégats, trainées fluorescentes, polymère).

Le principe de fonctionnement d'un microscope en épifluorescence est schématisé sur la figure 68.



1- Lampe à arc
2- Filtre d'excitation
3- Miroir dichroïque
4- Objectif
5- Échantillon
6- Filtre d'émission
7- Photomultiplicateur
8- Oculaire

Figure 68 Schéma de principe d'un microscope en épifluorescence

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le fait que nous sommes limités dans le choix du jeu de filtres : en effet, celui-ci doit permettre à la fois d'exciter de façon optimale l'échantillon (dans notre cas des supports greffés avec des traceurs fluorescents) et d'observer au maximum l'émission de fluorescence.

Au cours de notre étude, nous avons observé au microscope la fluorescence des deux traceurs CiNHS et CouNHS greffés sur les supports. Pour ce faire, nous avons utilisé deux jeux de filtres différents (Zeiss) dont les caractéristiques sont résumées ci-dessous :

	Jeu de filtres N°05	Jeu de filtres N°09
Fluorophore analysé	**CouNHS**	**CiNHS**
Filtre d'excitation (passe-bande)	$\lambda \in$ [**395 – 440**] nm	$\lambda \in$ [**450 – 490**] nm
Filtre dichroïque	λ = 460 nm	λ = 510 nm
Filtre d'émission (passe-haut)	$\lambda >$ **470** nm	$\lambda >$ **515** nm

Tableau 12 Caractéristiques spectrales des jeux de filtres N°05 et N°09 (Zeiss)

Pour chaque jeu, les spectres des filtres d'excitation et d'émission sont présentés en annexe (Annexe 4). Pour faciliter la lecture, nous désignerons dorénavant par "*5,cou*" et "*9,Ci*" les deux jeux de filtres permettant d'analyser respectivement CouNHS et CiNHS.

D.I.3. Etanchéité du polymère

Quelle que soit la méthode de localisation employée, il convient de s'assurer que les motifs en polymère formés à même les supports sont parfaitement étanches et imperméables aux diverses solutions de capping ou de greffage, ainsi qu'aux différents solvants utilisés pour les rinçages.

Pour ce faire, nous avons fabriqué des plots en polymère sur la surface de plaques S, puis les deux composés fluorescents acides sous forme d'esters de succinimidyle, CiNHS et CouNHS, ont été greffés par mouillage sur la face polymérisée. Après les traitements habituels permettant de désorber les fluorophores, les plots en polymères ont été décollés des supports par immersion dans du DMF ; les plaques ont ensuite été analysées au spectrofluorimètre ou au microscope à fluorescence, afin d'étudier la localisation des greffages covalents.

D.I.3.1. Greffage par mouillage de CiNHS sur des plaques polymérisées

Nous avons polymérisé sur une plaque S, en appliquant le protocole développé dans la troisième partie (partie C), deux plots mesurant 15 mm de diamètre et distants bords à bords de 6 mm (dimensions théoriques), le lasage ayant été réalisé dans les deux directions orthogonales avec un pas égal à 100 µm.
Nous avons greffé sur la face polymérisée le dérivé cinnamilydène, en opérant par mouillage pendant 4 h. Après avoir décollé le polymère dans du DMF, la plaque est soigneusement rincée, successivement dans de l'eau distillée, de l'éthanol, et du dichlorométhane.
Après séchage à l'air, la fluorescence a été mesurée au spectrofluorimètre en plusieurs points sur la plaque (10 mesures), à l'extérieur et à l'emplacement des plots (Figure 69).

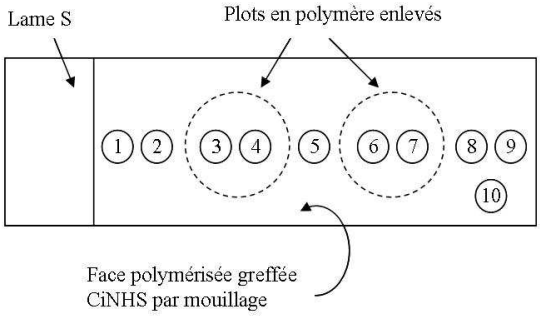


Figure 69 Greffage du cinnamilydène sur une plaque polymérisée
Analyse de la fluorescence au spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence sont présentés ci-après ; nous avons également reporté sur cette figure le spectre d'une lame S, réalisé dans les mêmes conditions (Figure 70).

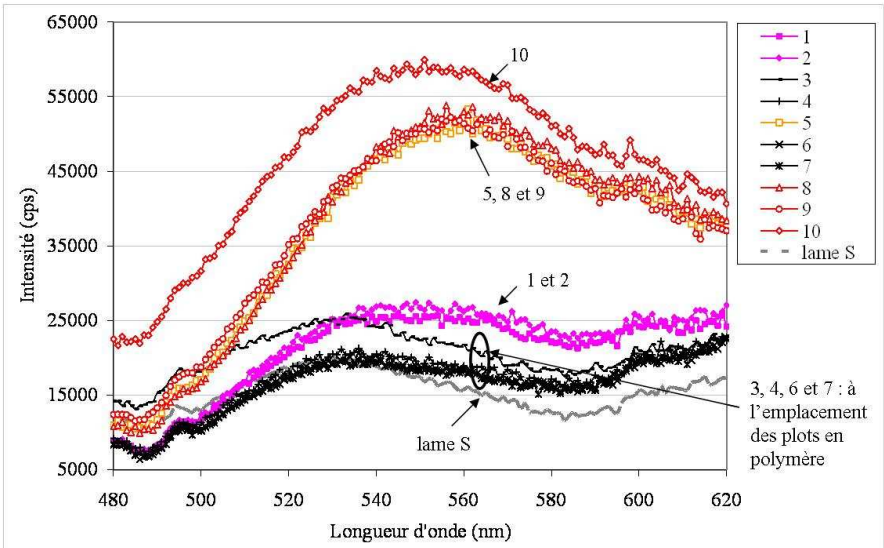


Figure 70 CiNHS greffé par mouillage sur la face polymérisée
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 470 nm, mode Sc/RC, f = 3 nm)

En ce qui concerne les spectres réalisés au niveau des plots (mesures 3, 4, 6 et 7), il apparaît très nettement qu'on retombe sur le signal de la plaque, ce qui traduit bien que le cinnamilydène ne s'est pas greffé à cet endroit, tandis qu'on observe du greffage à l'extérieur des plots (mesures 1, 2, 5, 8, 9 et 10). Le greffage n'est certes pas homogène et on ne détecte qu'un faible signal pour les deux premières mesures : ceci peut être dû à un mauvais mouillage à cet endroit. Cependant, malgré la faible amplitude des spectres correspondant aux mesures 1 et 2 (courbes roses), les maxima ne correspondent pas pour autant à ceux de la plaque, centrés sur 530 nm à l'émission.

A l'issue de cette première étude, nous pouvons conclure positivement quant à l'étanchéité et à l'imperméabilité des motifs en polymère ; nous allons cependant vérifier ce point en utilisant cette fois-ci le traceur fluorescent CouNHS.

D.I.3.2. Greffage par mouillage de CouNHS sur des plaques polymérisées

Nous avons polymérisé sur une plaque S, dans les mêmes conditions qu'au paragraphe D.I.3.1., deux plots mesurant 15 mm de diamètre et distants bords à bords de 6 mm

(dimensions théoriques). Le composé CouNHS est greffé sur cette face en procédant par mouillage pendant 4 h ; les plots sont ensuite enlevés par traitement dans le DMF, après quoi la plaque est rincée successivement dans de l'eau distillée, de l'éthanol et du dichlorométhane. Le greffage est ensuite analysé au spectrofluorimètre : la fluorescence a été mesurée en plusieurs points sur la plaque (10 mesures), à l'extérieur et au niveau des plots (Figure 71).

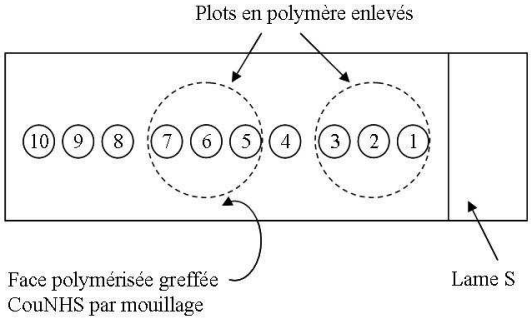


Figure 71 Greffage par mouillage de CouNHS sur une plaque polymérisée
Analyse au spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence sont présentés ci-après :

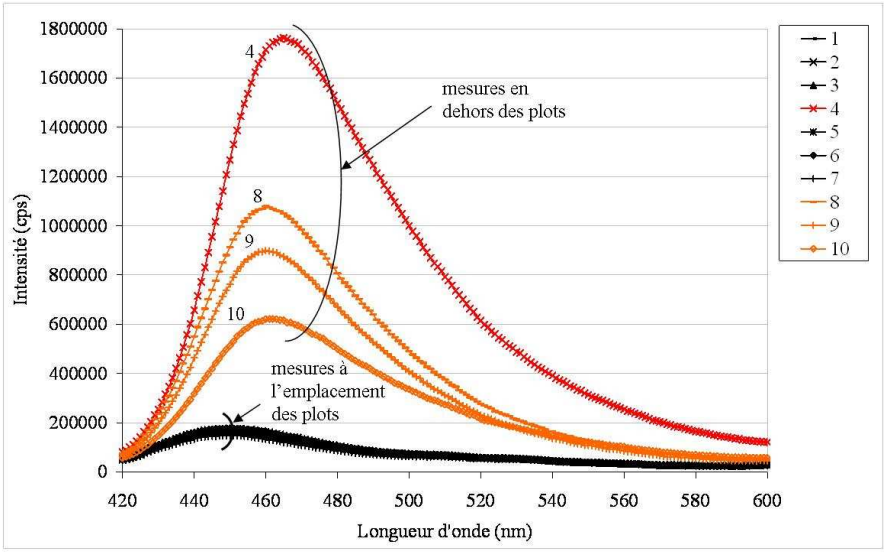


Figure 72 CouNHS greffé par mouillage sur la face polymérisée
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 410 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

On remarque que les maxima sont tous décalés par rapport à 467 ($\lambda_{ém}$), et ce d'autant plus que l'intensité de fluorescence est faible, ce qui correspond à une concentration en CouNHS greffé sur le support de plus en plus faible. Les maxima à l'émission se situent entre 450 et

465 nm. On retrouve là le phénomène (effet de concentration) déjà évoqué et expliqué dans la deuxième partie (cf. partie B, paragraphe B.IV.2.2.).

Il apparaît que le greffage a été réalisé avec succès à l'extérieur des plots (mesures 4, 8, 9 et 10), quoique de façon très inhomogène (écart maximum de 65 % !). Cependant, on observe également de la fluorescence à l'intérieur des plots, certes plus faible, mais qu'il convient de prendre en considération. Etant donné que les plaques ont été soigneusement rincées après greffage, les phénomènes d'adsorption sont à écarter. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables :

1) Les masques en polymère ne sont pas étanches.
2) Le polymère est perméable.
3) La solution de greffage est quand même venue mouiller la surface avec laquelle elle n'était pas en contact (face non polymérisée de la lame, à l'air libre au cours du greffage), d'où la fluorescence observée au niveau des plots.
4) Le greffage de CouNHS sur le support à l'intérieur des plots (après que ceux-ci aient été séparés des supports) a eu lieu au cours des étapes de rinçage : on peut imaginer qu'une certaine quantité de fluorophore ait été adsorbée sur la surface polymérisée au cours du greffage, qu'elle ait été relarguée dans les eaux de rinçages, et qu'elle se soit greffée sur les fonctions amine libres (notamment à la place des plots).

On peut d'ores et déjà rejeter l'hypothèse N°3 : la solution n'est jamais venue mouiller la surface à l'air libre au cours du greffage, et par ailleurs, si les deux faces du support avaient été mouillées, on observerait bien plus de greffage sur toute la surface de la lame.
Il semble également peu probable que CouNHS se soit greffé sur les fonctions amine libres lors des étapes de rinçage, étant donné que les solvants utilisés ne correspondent pas aux milieux préconisés dans la littérature pour le greffage sur supports aminés d'esters de succinimidyle ; de plus, on observerait là aussi plus de fluorescence partout sur la plaque. Enfin, comme nous le verrons plus loin à propos du greffage localisé par dépôt de CouNHS à l'intérieur des puits (cf. D.II.1.1.b.), bien que les rinçages aient été réalisés de la même façon une fois le polymère décollé, ce phénomène n'a pas été du tout observé, et le greffage est resté bien localisé.

Cette remarque permet également de rejeter l'hypothèse N°1 selon laquelle les motifs ne seraient pas étanches : en effet, comme nous allons le voir (cf. D.II.1.1.b), le greffage reste strictement localisé à l'intérieur des puits lorsqu'on procède par dépôt.
Il semble donc que le polymère soit perméable ; cependant, le signal observé sous les plots reste faible comparé aux surfaces directement en contact avec les solutions de greffage (9 % par rapport au point 4, et 26 % par rapport au point 10).

Nous avons dans un deuxième temps analysé cette plaque au <u>microscope à fluorescence</u> : nous avons réalisé un profil de ligne horizontal de l'intensité de fluorescence, de façon à pouvoir comparer l'extérieur et l'intérieur des plots (Figure 73). Pour ce faire, nous avons utilisé le jeu de filtres *5,cou*, et nous avons mesuré l'intensité en sortie du PM (grossissement : × 5, calibre : 2) en différents points le long d'une ligne passant par les deux plots (ligne A → F).

<u>Remarque</u> : Le diamètre de la surface d'observation (décagone régulier obtenu en diaphragmant le faisceau excitateur) mesure <u>600 µm</u> (ϕ_{obs}).

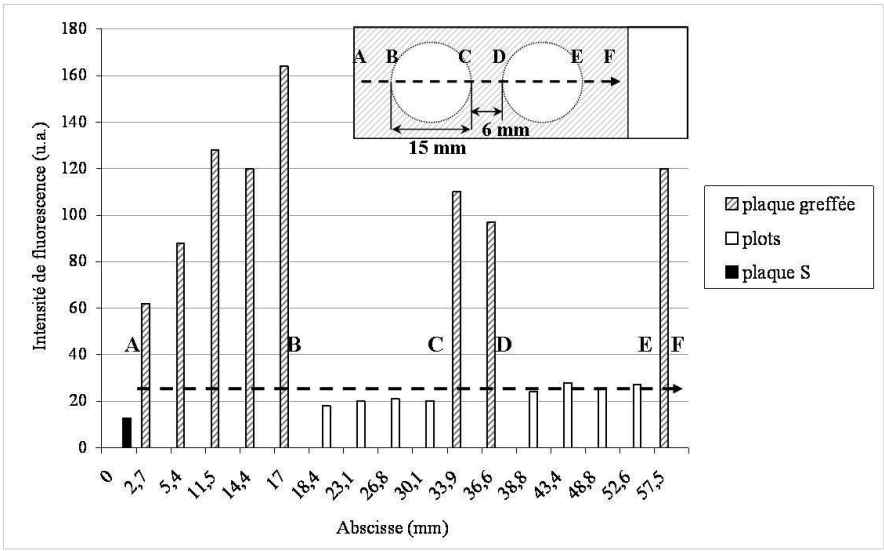


Figure 73 <u>Plots en polymère</u> : CouNHS greffé par mouillage sur la face polymérisée
Profil de ligne de l'intensité de fluorescence (jeu de filtres *5,cou*, grossissement : × 5, calibre 2)

Nous avons pu observer au microscope la fluorescence de CouNHS greffé sur le support : le contraste, en terme d'intensité de fluorescence, est excellent entre l'intérieur et l'extérieur des

plots. Le greffage semble par ailleurs parfaitement délimité : on observe distinctement à travers l'objectif deux disques noirs, et une intense fluorescence dans le bleu à l'extérieur des plots. Le profil présenté ci-dessus vient illustrer de façon quantitative et appuyer ces observations : la fluorescence est très intense quoique très inhomogène à l'extérieur des plots, et le signal est nettement plus faible à l'intérieur. On ne peut cependant pas l'assimiler à du bruit de fond, puisqu'il est toujours légèrement supérieur au signal moyen d'une plaque S vierge, mesuré le même jour et dans les mêmes conditions : ce faible signal de fluorescence signifie qu'il y a aussi eu du greffage à l'intérieur des plots, mais ce, dans une moindre proportion.

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces résultats que les motifs polymérisés ne sont pas totalement imperméables, mais que le greffage reste faible lorsque les sites sont protégés par le polymère par rapport aux surfaces directement en contact avec les solutions. Par ailleurs, il semble que lorsqu'on procède par mouillage, le greffage ne se fasse pas de façon homogène sur toute la surface fonctionnalisée du support.

D.II. Puits en polymère

Pour cette étude, nous avons utilisé les traceurs fluorescents CiNHS et CouNHS. Les premières expériences ont consisté à greffer à l'intérieur des puits, en procédant par mouillage ou par dépôt, un seul fluorophore par lame. Nous avons par la suite greffé les deux traceurs fluorescents sur une même lame, chacun dans un ou plusieurs puits distincts. Pour ces deux séries d'expériences, la durée des greffages, par dépôts ou par mouillage, est de 4 h. Enfin, nous avons réalisé plusieurs dépôts au cours du temps dans différents puits, ceci afin de déterminer la durée optimale des greffages pour chacun des deux fluorophores.

D.II.1. Greffage localisé sur une lame d'un seul fluorophore

Les mêmes expériences ont été réalisées avec les deux fluorophores CiNHS et CouNHS : chacun d'eux a été greffé sur des lames S, à l'intérieur de puits en polymère, par mouillage ou par dépôt. Les puits en polymère formés mesurent tous 15 mm de diamètre (d_{th}) et sont au nombre de deux par plaque. Le mode opératoire est le même pour toutes les expériences dont il est question dans ce paragraphe, seul diffère le mode de greffage (par mouillage ou par dépôt) et la nature du composé greffé (*greffage :* 4 h, à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique, lorsque le greffage est réalisé par mouillage ; sous atmosphère saturée en tampon à pH 8,5 si on effectue des dépôts à l'intérieur des puits ; *rinçages :* 3 h dans H_2O, 2 h dans EtOH, 1 h dans CH_2Cl_2). Le polymère est ensuite séparé du support, et les plaques sont analysées par spectroscopie et/ou microscopie de fluorescence.

D.II.1.1. Greffage localisé de CouNHS à l'intérieur des puits

D.II.1.1.a Greffage réalisé par mouillage

Le greffage a été analysé au microscope à fluorescence avec le jeu de filtres *5,cou*. Un profil de ligne de l'intensité de fluorescence a été réalisé sur toute la longueur de la plaque (Figure 74).

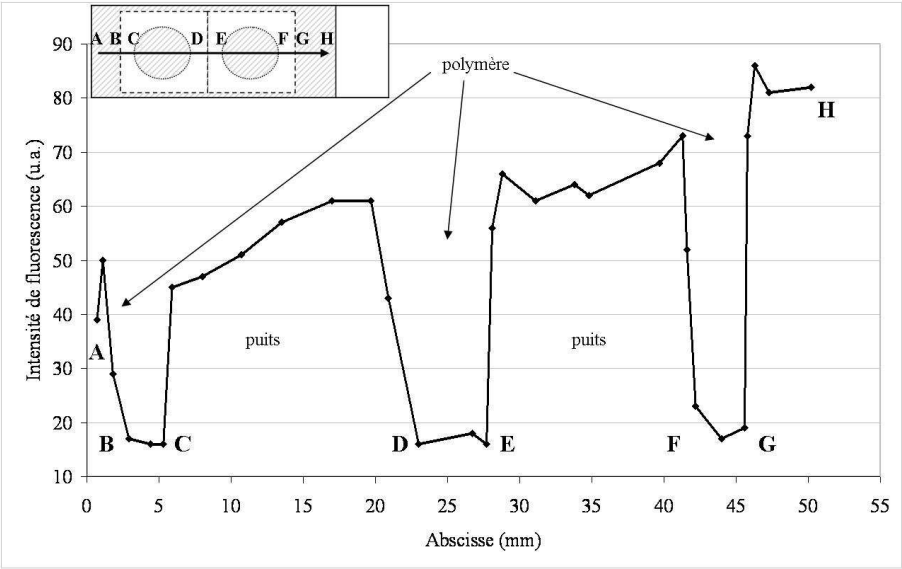


Figure 74 Puits en polymère : CouNHS greffé par mouillage sur la face polymérisée
Profil de ligne de l'intensité de fluorescence (jeu de filtres *5,cou*, grossissement : × 5, calibre 2)

Il apparaît que CouNHS s'est greffé partout sur le support en dehors de la zone polymérisée, aussi bien à l'intérieur des puits (segments CD et EF), qu'à l'extérieur des motifs (segments AB et GH). L'intensité de fluorescence reste faible au niveau du polymère, mais ce signal peut cependant être significatif, comme nous avons pu le constater au paragraphe D.1.3.2. Là encore, nous avons pu remarquer à travers l'objectif, que le greffage semblait bien localisé en dehors du polymère, et notamment à l'intérieur des puits (Figure 75).

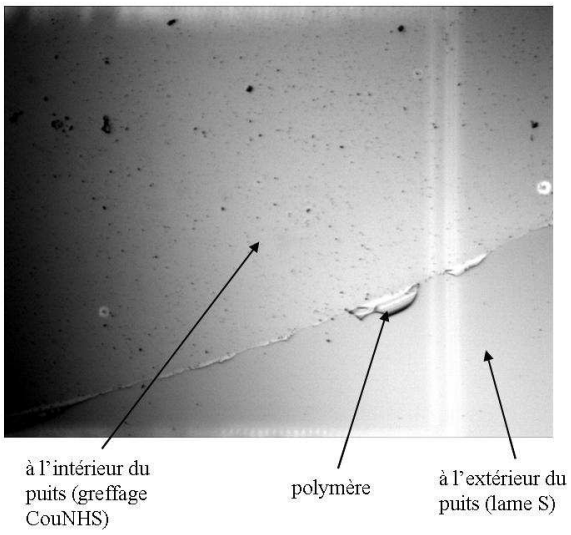


Figure 75 Photo d'un puits en polymère greffé avec CouNHS par mouillage (logiciel Image Pro Plus, *Media Cybernetics*)

Nous avons ensuite analysé cette plaque au spectrofluorimètre, dans le but de vérifier s'il y a eu, ou pas, greffage au niveau des sites $-NH_2$ protégés par le polymère. La fluorescence a été mesurée en plusieurs points le long de la plaque (Figure 76).

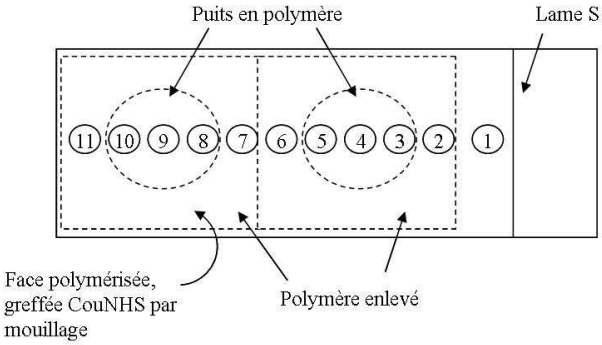


Figure 76 Greffage par mouillage de CouNHS sur une plaque S avec deux puits en polymère
Analyse au spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence sont présentés ci-dessous :

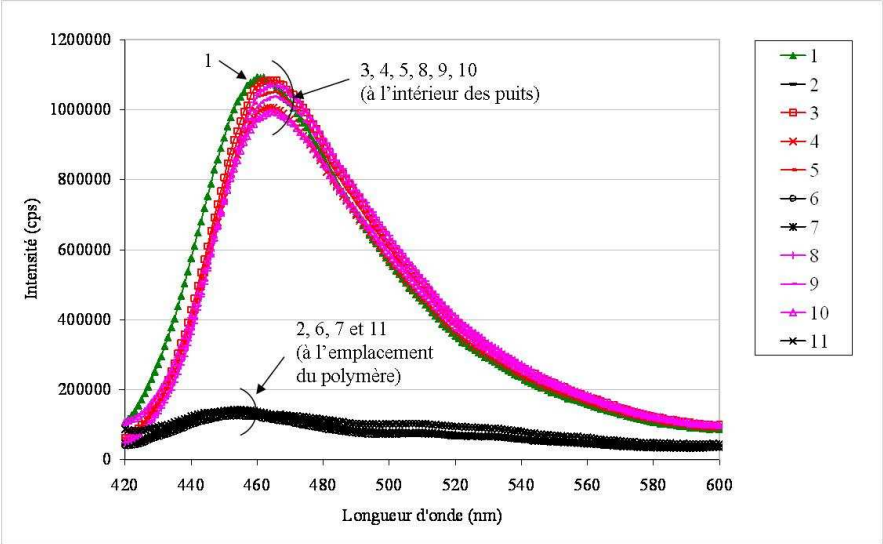


Figure 77 Greffage par mouillage de CouNHS sur une plaque S avec deux puits en polymère
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 410 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

On remarque que les maxima à l'émission ($455 < \lambda_{ém} < 465$ nm) sont là encore décalés.

La fluorescence est particulièrement intense à l'intérieur des puits et à l'extérieur du motif polymère ; cependant on observe également du signal au niveau des sites protégés (mesures 2, 6, 7 et 11). Le greffage effectif sous le polymère représente environ 10 % du greffage sur la surface directement mouillée par la solution.

D.II.1.1.b Greffage réalisé par dépôt

Nous avons déposé dans chacun des deux puits (d_{th} = 15 mm) en utilisant une micropipette, 280 µL de solution de CouNHS dans le tampon à pH 8,5 ; la réaction est conduite sous atmosphère saturée en tampon, ceci afin de prévenir une éventuelle évaporation des dépôts. Etant donné le caractère hydrophobe des lames S, le greffage étant réalisé en milieu aqueux, les gouttes restent bien formées à l'intérieur des puits et ne s'étalent pas sur le polymère. A l'issue du greffage, soit au bout de 4 h, les dépôts ont été réaspirés, le polymère décollé du support et les plaques soigneusement rincées. Le greffage a alors été analysé par les deux techniques fluorimétriques.

- *Analyse au microscope à fluorescence :*

Le greffage a été analysé avec le jeu de filtre *5,cou*: un profil de ligne de l'intensité de fluorescence a été réalisé sur toute la longueur de la plaque (Figure 78).

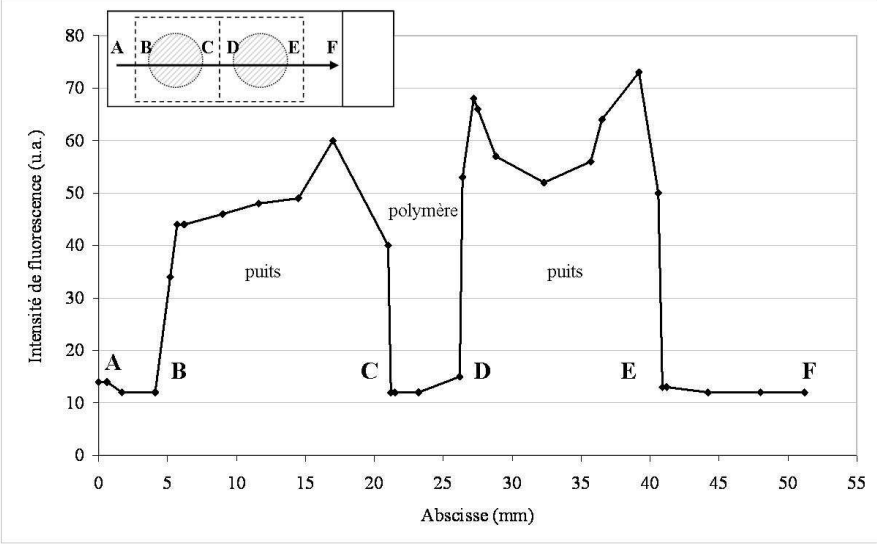


Figure 78 CouNHS greffé par dépôt à l'intérieur de deux puits en polymère
Profil de ligne de l'intensité de fluorescence (jeu de filtres *5,cou*, grossissement : × 5, calibre 2)

Le greffage par dépôt à l'intérieur des deux puits est réussi, mais n'est là encore pas très homogène. Les analyses ont été réalisées avec le même grossissement au microscope et les intensités mesurées ont été lues sur le même calibre que celui utilisé dans le cas des plaques

greffées par mouillage : l'intensité de fluorescence est comparable dans les deux cas (entre 50 et 70 u.a).

L'intensité mesurée est très faible et pratiquement constante sur toute la surface extérieure aux puits. Etant donné que les dépôts sont restés bien localisés, on peut considérer que ce signal correspond au bruit de fond ; par ailleurs, on observe le même signal entre les deux puits (segment CD) qu'en bout de plaque (en A et F).

- *Analyse au spectrofluorimètre :*

Cette plaque a également été analysée avec le FluoroLog 3 : la fluorescence a été mesurée en plusieurs points le long d'une ligne passant par les puits (Figure 79).

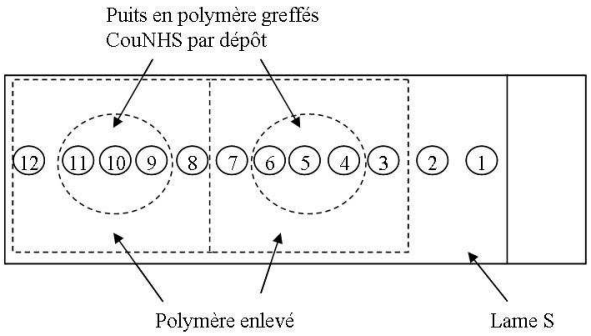


Figure 79 CouNHS greffé par dépôt à l'intérieur de deux puits en polymère
Analyse au spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence sont présentés sur la figure 80.

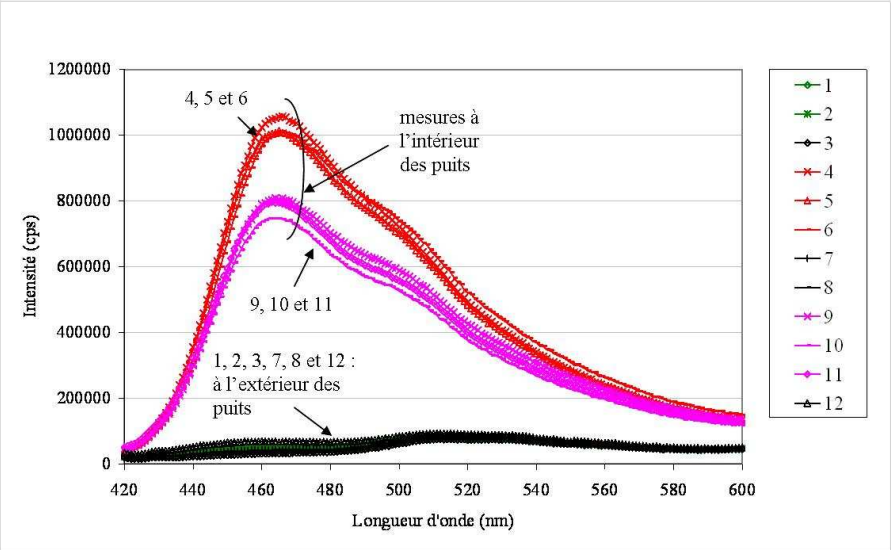


Figure 80 CouNHS greffé par dépôt à l'intérieur de deux puits en polymère
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 410 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Remarque : Sur les spectres réalisés à l'intérieur des puits, on distingue entre 500 et 520 nm la fluorescence intrinsèque du support.

Par cette méthode, il apparaît bien que le greffage de CouNHS sur le support est strictement localisé à l'intérieur des puits en polymère : en effet, partout à l'extérieur on retrouve le signal de la plaque. On ne constate pas non plus d'adsorption à aucun endroit sur le support. Le greffage semble par ailleurs homogène à l'intérieur de chaque puits ; il subsiste néanmoins une différence entre les deux puits, comme on peut également l'observer sur le profil de ligne réalisé au microscope. Les deux techniques d'analyse employées permettent donc d'accéder aux mêmes résultats en ce qui concerne le greffage covalent de CouNHS sur une lame S.

D.II.1.2. Greffage localisé de CiNHS à l'intérieur des puits

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le cinnamilydène : CiNHS a été greffé sur deux plaques à l'intérieur de puits en polymère, en procédant par dépôt pour l'une et par mouillage pour l'autre. Les greffages ont ensuite été analysés au spectrofluorimètre et au microscope à fluorescence avec le jeu de filtres *9,Ci* ; les spectres mesurés avec le FluoroLog 3 n'ont rien révélé de probant.

Les profils de lignes réalisés au microscope sont présentés sur la figure 81 ; pour chacune des deux plaques, nous avons mesuré en sortie du PM l'intensité de la fluorescence en différents points le long d'une ligne passant par les deux puits.

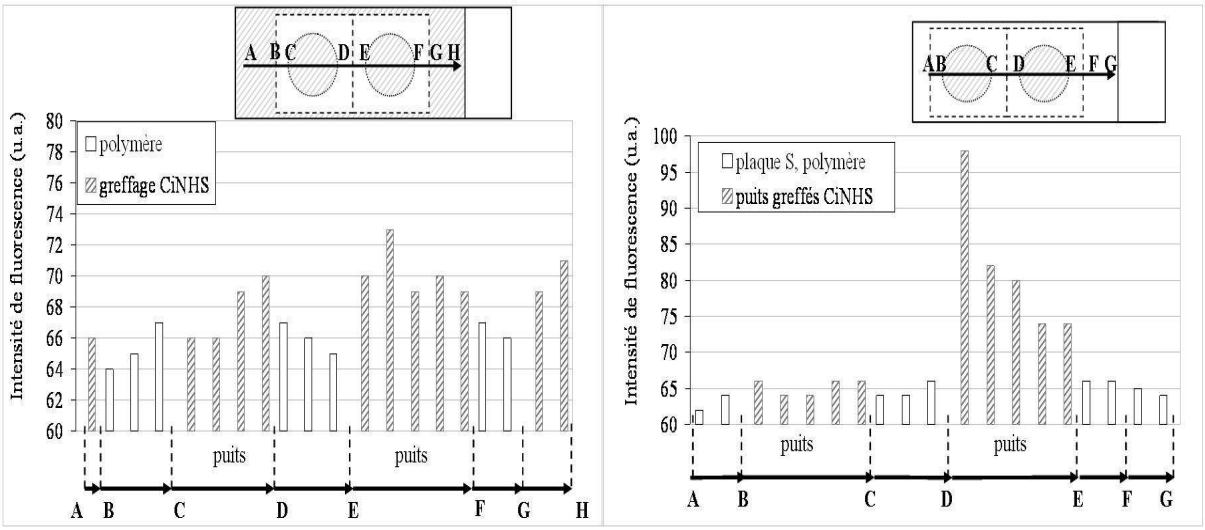


Figure 81 Puits en polymère : profils de ligne de l'intensité de fluorescence CiNHS greffé par mouillage (profil de gauche), ou par dépôt à l'intérieur des puits (profil de droite) (jeu de filtres *9,Ci*, grossissement : × 5, calibre 4)

Dans le cas où le greffage est réalisé par mouillage sur la surface polymérisée (profil de gauche), on détecte en moyenne un peu plus de fluorescence à l'intérieur des puits (segments CD et EF) et en bout de lame (segment GH). Ce signal, bien que très faible, étant statistiquement légèrement plus intense qu'au niveau du polymère, on ne peut l'assimiler à du bruit de fond. Il semble donc qu'il y ait bien eu du greffage sur les sites $-NH_2$ libres, mais peu, si bien qu'on le détecte difficilement avec les techniques fluorimétriques, pourtant très sensibles. Ceci n'est pas particulièrement surprenant : comme nous avons pu le remarquer en deuxième partie (spectres de fluorescence de CiNHS greffé sur une lame S, Figure 24, partie B), la fluorescence émise par le cinnamilydène greffé sur le support n'est pas très intense, et ce, alors que le greffage a été réalisé sur les deux faces du support (intensité de fluorescence double en première approximation par rapport à ici !).
Il n'est à fortiori pas possible de déterminer dans ce cas s'il y a eu, ou pas, du greffage sous le polymère.

Sur le profil de droite, on ne détecte de la fluorescence que dans un puits (entre D et E), alors que le même volume de solution (280 µL) a été déposé simultanément dans chacun

des deux puits. Par ailleurs la fluorescence observée entre D et E est particulièrement intense, notamment si on la compare avec les valeurs obtenues par mouillage (profil de gauche). Il semble donc très peu probable que ce signal corresponde à du greffage ; nous pensons qu'il s'agit là d'adsorption ce qui sous-entend que la plaque aurait été mal rincée. En ce qui concerne le pic le plus intense à 98 u.a. (en D), cette valeur à été mesurée à la frontière entre l'intérieur et l'extérieur du puits ; or nous avons pu remarquer qu'il restait sur les pourtours des motifs quelques fragments de polymère adhérant bien au support, et qui sont responsables de la fluorescence observée en D.

Les résultats obtenus avec le cinnamilydène ne nous permettent donc pas de conclure quant au succès des greffages et à leur localisation à l'intérieur des puits. La fluorescence émise par CiNHS est difficile à détecter au spectrofluorimètre et au microscope à fluorescence, à fortiori lorsque le greffage est faible (greffage par mouillage).

La fluorescence émise par CouNHS est quant à elle particulièrement intense. Nous pouvons donc dire, à l'issue des expériences réalisées avec ce traceur, que les greffages sont parfaitement localisés à l'intérieur des puits si on procède par dépôt ; a contrario, on observe de la fluorescence (probablement du greffage) sous le polymère lorsqu'on procède par mouillage, mais ce, dans une moindre proportion : cette fluorescence représente 10 % du signal émis à l'extérieur du polymère, soit lorsque le greffage est réalisé à même la surface fonctionnalisée (sur les sites $-NH_2$).

D.II.2. Greffage localisé de deux fluorophores différents sur une même lame

D.II.2.1. Greffage localisé de CiNHS et de CouNHS à l'intérieur de 2 puits distincts

Nous avons greffé par dépôt, dans deux puits distincts (d_{th} = 15 mm), les deux fluorophores CiNHS et CouNHS. Nous avons déposé 280 µL de solution à l'intérieur de chaque puits. La réaction est conduite sous atmosphère saturée en tampon (pH 8,5), à température ambiante, et

à l'abri de la lumière. Nous avons cette fois-ci laissé réagir 6 h, après quoi les dépôts ont été réaspirés, le polymère décollé, et les plaques soigneusement rincées.

L'analyse des greffages a été réalisée au microscope à fluorescence : nous avons mesuré l'intensité de fluorescence en plusieurs points, à l'intérieur comme à l'extérieur des puits, en utilisant les deux jeux de filtres (*5,cou* et *9,Ci*) pour pouvoir comparer les résultats (figures 82 et 83).

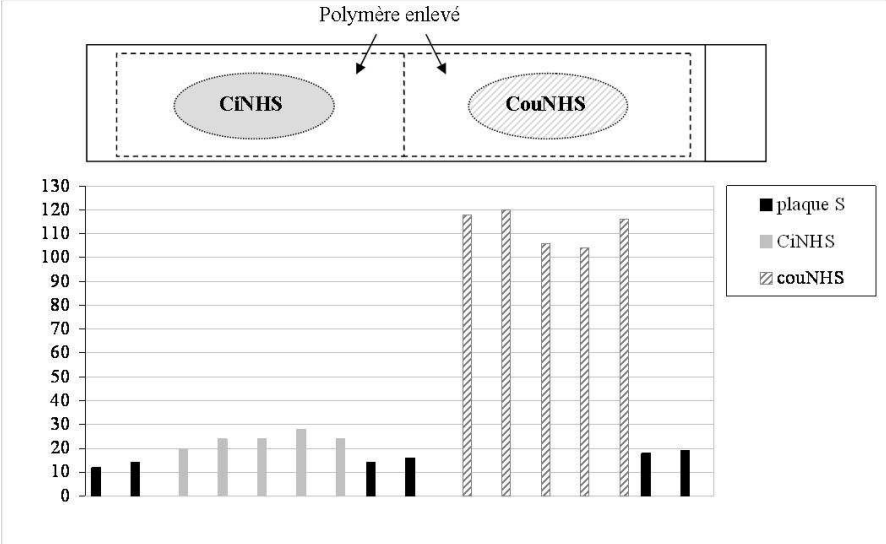


Figure 82 Deux puits greffés CiNHS et CouNHS par dépôt
Analyse au microscope avec le jeu de filtres *5,cou* (grossissement ×5, calibre 2)

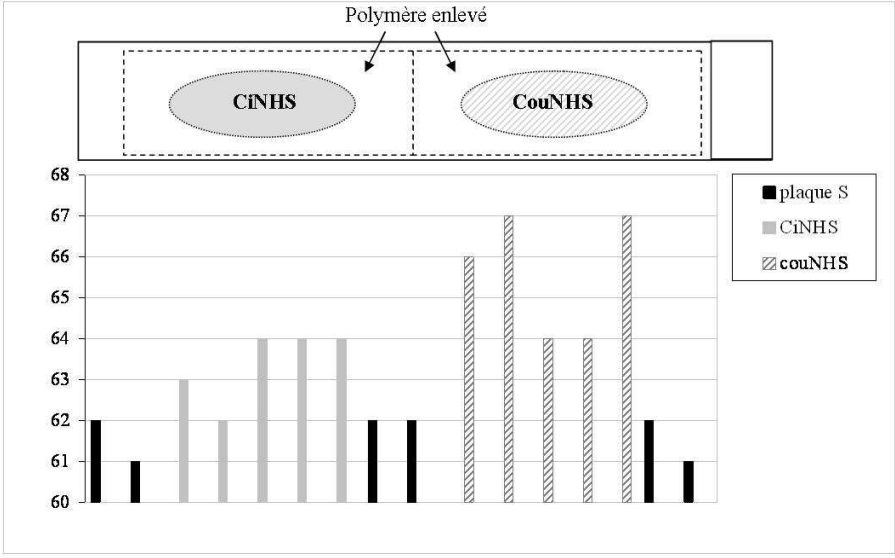


Figure 83 Deux puits greffés CiNHS et CouNHS par dépôt
Analyse au microscope avec le jeu de filtres *9,Ci* (grossissement ×5, calibre 4)

Pour plus de clarté, nous appellerons "P_{Ci}" et "P_{cou}", les puits à l'intérieur desquels nous avons greffé CiNHS et CouNHS respectivement.

Les mesures notées "plaque S" sur les graphes présentés ci-dessus ont été réalisées aléatoirement à l'extérieur des puits.

On remarque tout d'abord que quel soit le jeu de filtre utilisé, on distingue la fluorescence de CouNHS à l'intérieur de P_{cou}, et celle de CiNHS à l'intérieur de P_{Ci}. Etant donné que les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des deux fluorophores greffés sur lames S sont larges, et que les filtres à l'émission sont des passe-haut, il est logique que ces deux jeux de filtres permettent de détecter à la fois la fluorescence de CiNHS et celle de CouNHS. Cependant, le jeu de filtres *5,cou* est bien plus approprié pour observer la fluorescence de CouNHS.

Le greffage semble être assez homogène à l'intérieur de chaque puits. On distingue cette fois-ci plus de fluorescence à l'intérieur de P_{Ci}, ce qui signifie que le greffage de CiNHS à l'intérieur de ce puits a été optimisé par rapport au paragraphe II.1.2. La différence au niveau du mode opératoire réside dans la durée du greffage, plus longue dans ce cas-ci (6 h contre 4 h au paragraphe D.II.1.2).

D.II.2.2. Greffage localisé de CiNHS et de CouNHS à l'intérieur d'une matrice de puits

Nous avons polymérisé sur une plaque S une matrice (2×5) puits de 5 mm de diamètre (d_{th}), distants bords à bords de 3 mm. Nous y avons greffé alternativement CiNHS et CouNHS (Figure 84).

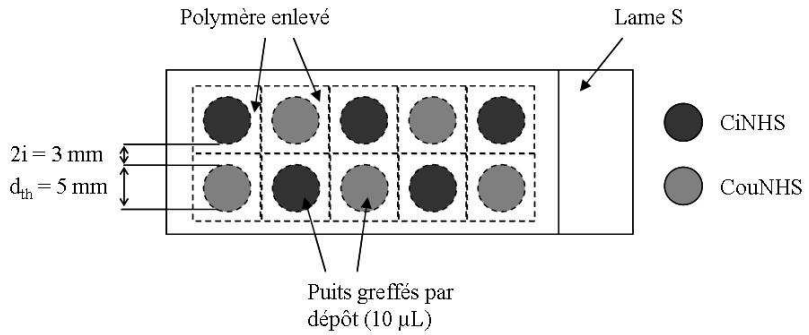


Figure 84 Matrice (2×5) puits (d_{th} = 5 mm, 2i = 3 mm) CiNHS et CouNHS greffés alternativement par dépôts

10 µL de solution ont été déposés à l'intérieur de chaque puits, et nous avons laissé réagir 6 h. Le polymère est ensuite décollé du support, la plaque soigneusement rincée puis analysée au microscope à fluorescence. Cinq mesures de fluorescence ont été prises avec les deux jeux de filtres (*5,cou* et *9,Ci*) à l'intérieur de chaque puits et à l'extérieur de la matrice (figures 85 et 86).

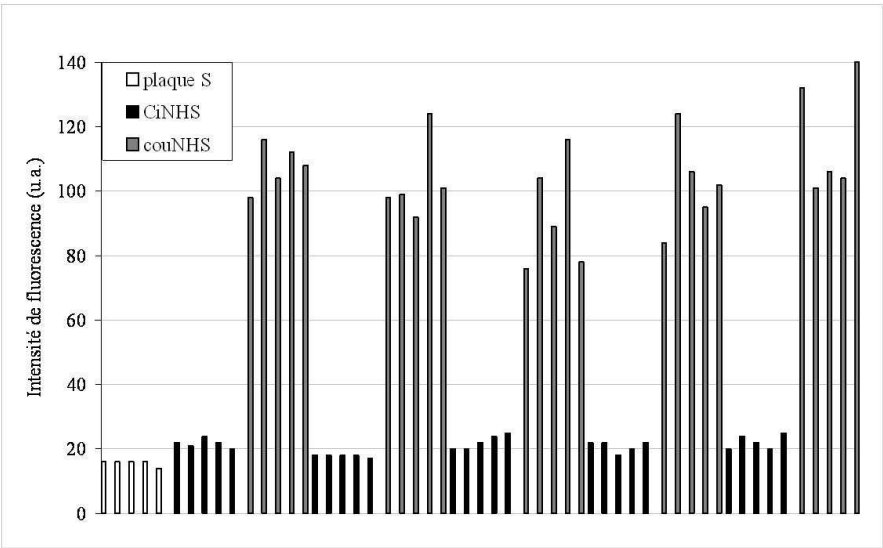


Figure 85 Dix puits greffés alternativement avec CiNHS et CouNHS par dépôt
Analyse au microscope avec le jeu de filtres *5,cou* (grossissement : ×5, calibre 2)

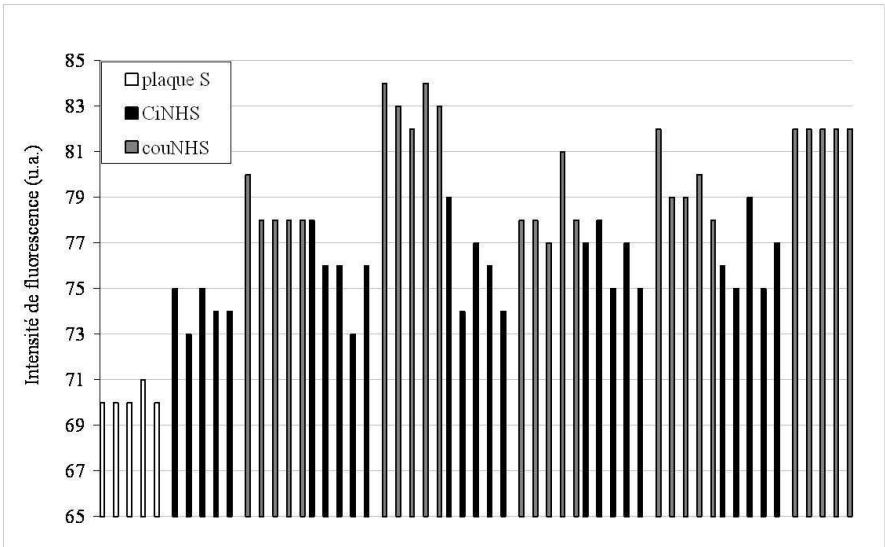


Figure 86 10 puits greffés alternativement avec CiNHS et CouNHS par dépôt
Analyse au microscope avec le jeu de filtres *9,Ci* (grossissement : ×5, calibre 4)

Remarque : Nous avons effectué un agrandissement du graphique présenté sur la figure 86 (origine de l'axe des ordonnées à 65 u.a.) pour mettre en évidence les écarts entre les différents puits.

Nous noterons de nouveau P_{Ci} les puits à l'intérieur desquels nous avons réalisé le greffage de CiNHS, et P_{cou} ceux dans lesquels nous avons greffé le traceur CouNHS.
Lorsqu'on utilise le jeu de filtres *5,cou* (Figure 85), on observe distinctement la fluorescence de CouNHS à l'intérieur des puits P_{cou} ; on distingue également la fluorescence de CiNHS à l'intérieur des autres puits P_{Ci} : en effet, l'intensité y est toujours plus élevée que sur la plaque S vierge. Sur la figure 86, on observe aussi alternativement dans les puits la fluorescence des deux traceurs.

Nous avons reporté pour chaque jeu de filtres, la dispersion de l'intensité de fluorescence autour de la valeur moyenne à l'intérieur de chaque puits (Figure 87) :

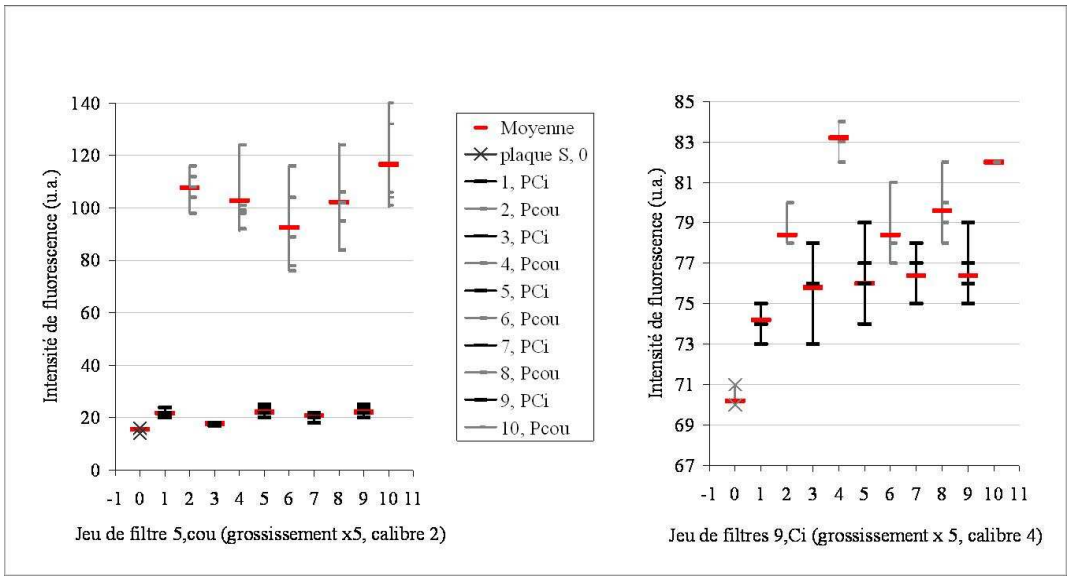


Figure 87 Dispersion de l'intensité de fluorescence autour de la valeur moyenne à l'intérieur de chaque puits - <u>à gauche</u> : jeu de filtres *5,cou* (grossissement : ×5, calibre 2)
<u>à droite</u> : jeu de filtres *9,Ci* (grossissement : ×5, calibre 4)

Lorsqu'on utilise le jeu de filtres le mieux approprié pour observer la fluorescence de CiNHS (jeu *9,Ci*) et de CouNHS (jeu *5,cou*), on constate que le greffage est <u>en moyenne</u> homogène entre les différents puits P_{Ci} d'une part, et P_{cou} d'autre part, mais que la dispersion n'est pas négligeable à l'intérieur de chaque puits.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude sont très satisfaisants : nous avons montré qu'il était possible de greffer deux traceurs fluorescents par une liaison amide sur des sites parfaitement localisés et distincts de la surface silanisée.

D.II.3. Greffages localisés réalisés au cours du temps

D.II.3.1. Greffages de CiNHS et de CouNHS réalisés au cours du temps

Les greffages restent bien localisés sur la surface du support lorsqu'on effectue des dépôts à l'intérieur des puits : dans ce cas, ceux-ci peuvent être assimilés à des mini réacteurs indépendants. Nous pouvons ainsi réaliser différentes expériences sur une même plaque, dans chacun des puits. Au cours de l'étude précédente, nous avons greffé isolément deux traceurs différents sur une même lame (D.II.2.) ; nous allons à présent faire varier la durée des réactions dans chaque puits, pour les deux fluorophores CiNHS et CouNHS.

Les expériences réalisées avec les deux traceurs ont été conduites en parallèle sur deux lames S, sur lesquelles nous avons polymérisé des matrices de puits de 5 mm de diamètre (d_{th}) et distants bords à bords de 3 mm. Nous avons espacé les dépôts au cours du temps, de telle sorte que la durée des greffages varie entre 6 et 80 h pour le cinnamilydène, et entre 3 et 48 h pour CouNHS ; nous avons déposé dans chaque puits le même volume de solution : 10 µL.

Bien que les plaques aient été maintenues sous atmosphère saturée en tampon à pH 8,5, nous n'avons pu prévenir l'évaporation du solvant dans les cas où la durée de la réaction excède 24 h. Les produits ayant alors cristallisé à l'intérieur des puits, nous avons dû intensifier les rinçages afin que la fluorescence détectée au microscope corresponde bien à du greffage, et non à de l'adsorption. Les plaques ont ensuite été analysées au microscope à fluorescence en utilisant le jeu de filtre le mieux approprié pour chaque traceur (Figure 88).

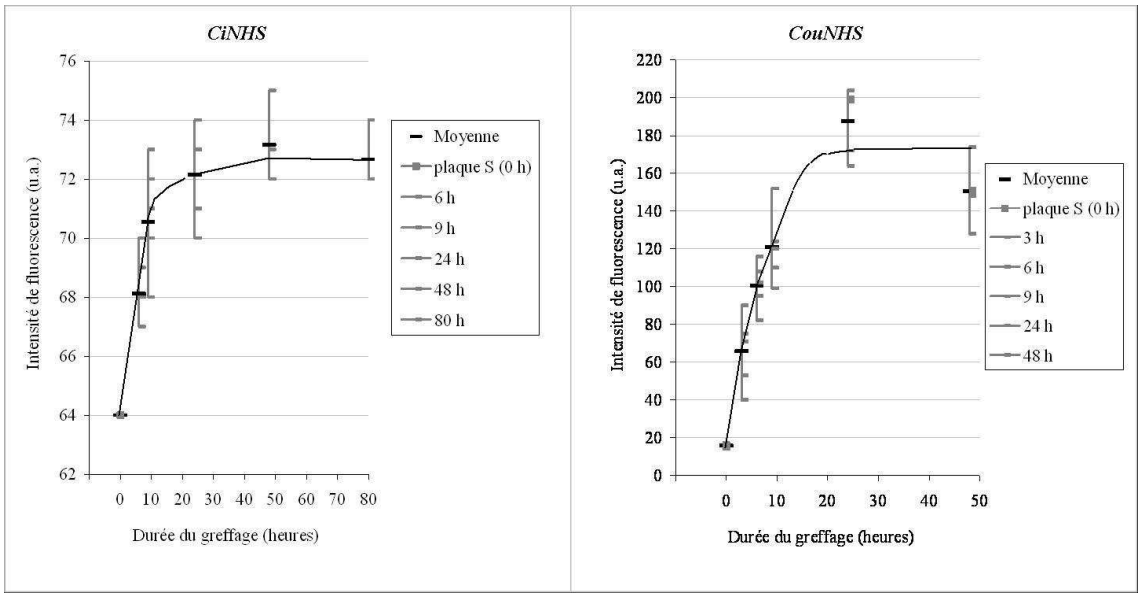


Figure 88 Analyse au microscope des greffages à l'intérieur des puits
à gauche : greffage de CiNHS entre 6 et 80 h, jeu de filtres *9,Ci* (grossissement : ×5, calibre 4)
à droite : greffage de CouNHS entre 3 et 48 h, jeu de filtres *5,cou* (grossissement : ×5, calibre 2)

La tendance observée sur ces deux profils est similaire : l'intensité moyenne de fluorescence croît avec la durée de la réaction et le maximum de greffage est atteint au bout de 24 h pour CiNHS comme pour CouNHS. Dans le cas de CiNHS, passé 24 h la concentration varie peu et il semble qu'on ait atteint un plafond. On observe pour CouNHS une diminution de l'intensité moyenne de fluorescence entre 24 et 48 h : étant donné qu'il s'agit d'une moyenne statistique réalisée à partir d'un signal dispersé à l'intérieur de chaque puits, nous attribuons logiquement cette diminution au nombre insuffisant de mesures (5). Il est probable qu'on ait également atteint un plafond au bout de 24 h.

Dans les deux cas, le signal est dispersé autour de la valeur moyenne à l'intérieur de chaque puits, ce qui signifie que le greffage n'y est pas homogène.

D.II.3.2. Greffage optimisé de CiNHS à l'intérieur d'un puits

Etant donné que jusqu'ici nous n'avons toujours détecté qu'un très faible signal avec CiNHS, maintenant que nous connaissons la durée optimale de greffage, nous avons souhaité établir un profil de l'intensité de fluorescence pour ce traceur, greffé à l'intérieur d'un puits mesurant 13 mm de diamètre (d_{th}). Pour limiter l'évaporation, nous avons cette fois-ci déposé un plus grand volume de solution à l'intérieur du puits, soit 300 µL, et nous avons laissé réagir 24 h, sous atmosphère saturée en tampon. Après avoir séparé le polymère du support, la plaque est soigneusement rincée puis analysée au microscope à fluorescence (Figure 89) : nous avons réalisé plusieurs profils de l'intensité de fluorescence à l'intérieur du puits, en effectuant un balayage dans les deux directions orthogonales (profils de ligne "horizontal" et "vertical").

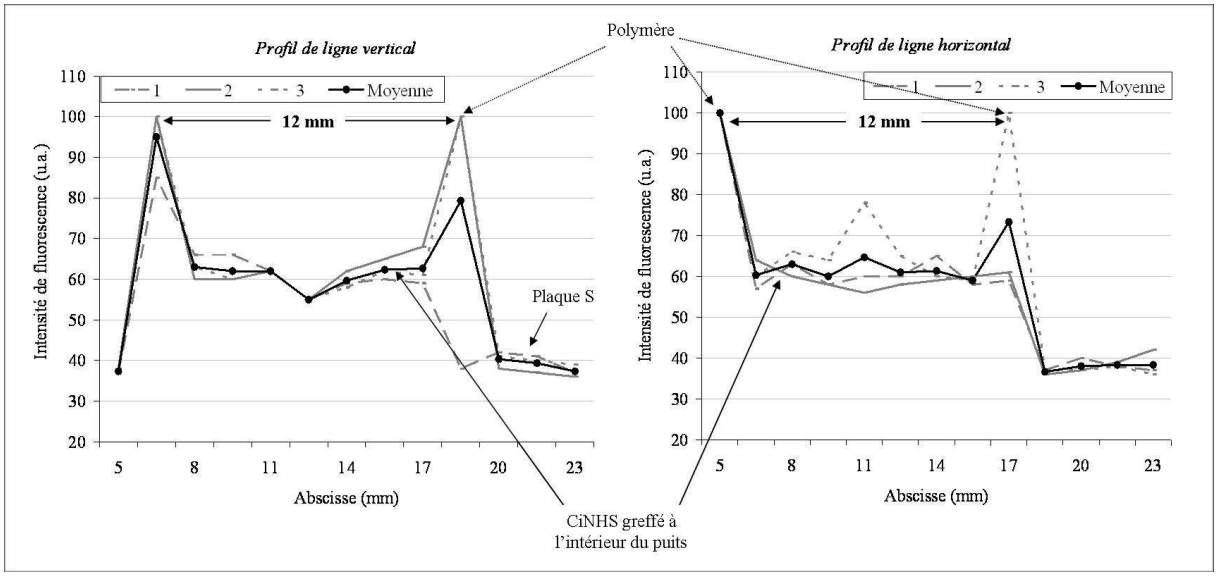


Figure 89 Analyse au microscope du greffage de CiNHS
à gauche : profil de ligne "vertical", à droite : profil de ligne "horizontal"
jeu de filtres *9,Ci* (grossissement : ×5, calibre 3)

On observe cette fois-ci distinctement la fluorescence de CiNHS greffé à l'intérieur du puits. Le greffage est homogène dans les deux directions orthogonales et reste parfaitement localisé. Les artéfacts mesurés à 6,5 et 18,5 mm sur le profil de ligne vertical, et à 5 et 17 mm sur le profil de ligne horizontal, correspondent à des fragments de polymère restés accrochés sur le support au niveau du pourtour du puits.

D.III. Plots en polymère

Cette méthode consiste à localiser les greffages au niveau des sites $–NH_2$ protégés par le polymère. Il convient au préalable de protéger chimiquement toutes les autres fonctions amine présentes sur la surface du support, même s'il est probable que la réaction ne soit pas strictement localisée à l'extérieur des plots, compte tenu de la perméabilité du polymère. Avant toutes choses, il s'agit de vérifier qu'il est possible de réaliser des greffages à l'emplacement des plots, une fois le polymère ôté du support.

D.III.1. Etude de la réactivité des sites $–NH_2$ protégés par le polymère

Nous avons polymérisé sur une lame S deux plots mesurant 18 mm de diamètre (d_{th}) et distants bords à bords de 2 mm. Après les avoir décollés du support en immergeant la plaque dans du DMF, nous avons greffé le cinnamilydène sur toute cette surface (celle sur laquelle ont été réalisées les polymérisations), en procédant par mouillage pour pouvoir comparer les résultats du greffage entre l'intérieur et l'extérieur des plots. La lame est soigneusement rincée, puis analysée au spectrofluorimètre :

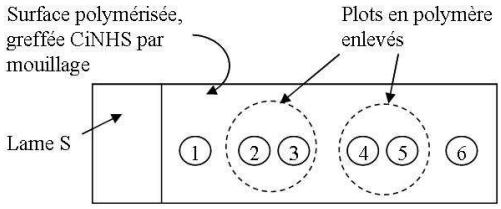


Figure 90 Greffage par mouillage de CiNHS sur toute la face polymérisée
Analyse au spectrofluorimètre

Nous avons en réalité mesuré la fluorescence en 4 points à l'intérieur de chaque plot (soit 10 mesures au total) : étant donné que le signal est homogène au niveau du polymère, pour ne pas surcharger les graphes, nous ne présenterons ici que les spectres correspondant aux mesures 1 à 6 reportées sur la figure 90 ; les autres courbes sont jointes en annexe (Annexe 5).

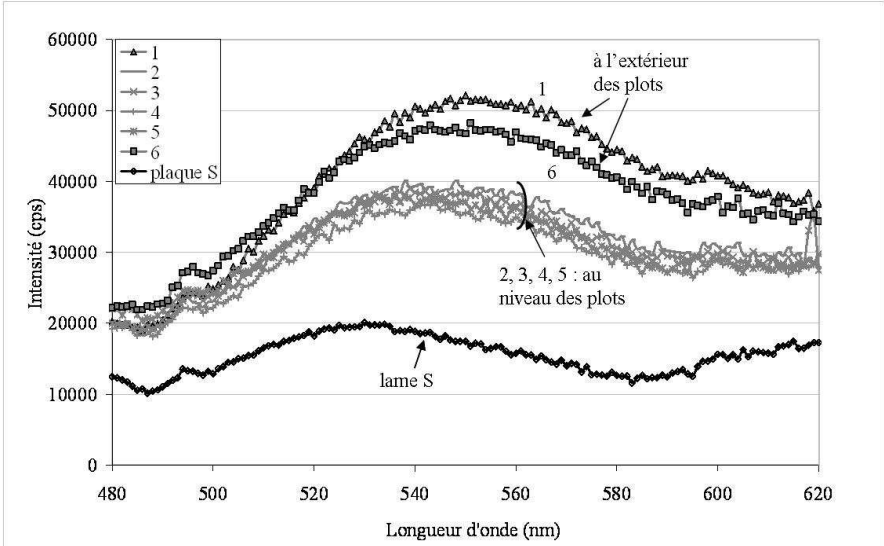


Figure 91 CiNHS greffé par mouillage sur toute la surface polymérisée (plots décollés)
Spectres d'émission de fluorescence ($\lambda_{exc.}$ = 470 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Nous avons également reporté sur cette figure le spectre d'une plaque S vierge, mesuré dans les mêmes conditions.

On remarque que le traceur CiNHS s'est greffé sur toute la surface du support, aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des plots. On détecte cependant moins de signal au niveau des plots, ce qui semble indiquer qu'on ne récupère pas toutes les fonctions amines protégées par le polymère. Après avoir soustrait le signal de la plaque des spectres 1 à 6, on trouve par le calcul que le greffage à l'emplacement des plots représente 65 % du recouvrement sur le reste de la surface. Environ un tiers des fonctions amines initialement présentes sur cette surface ont donc été perdues. Etant donné que ces supports sont préparés en vue de réaliser le greffage covalent d'anticorps qui sont des molécules très encombrées, le taux de recouvrement effectif sur les supports, rapporté à la densité surfacique des lames, sera dans tous les cas faible en proportion.

D.III.2. Protection chimique des fonctions amine

Pour protéger chimiquement les fonctions amine libres présentes sur la surface du support, nous avons choisi d'y greffer l'acide dodécanoïque via une liaison amide, après l'avoir au préalable activé avec le N-hydroxysuccinimide.

D.III.2.1. Activation de l'acide dodécanoïque par le NHS et greffage sur les supports

L'activation de l'acide dodécanoïque sous forme d'ester de succinimidyle est réalisée suivant le protocole appliqué aux traceurs fluorescents acides (CiCOOH et CouCOOH), qui est décrit dans la deuxième partie (§ B.V.4.1. et B.V.4.2.).

Son greffage sur les supports est de la même manière réalisé dans une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5. L'acide activé s'est révélé être très peu soluble en milieu aqueux. Nous avons malgré tout immergé 3 plaques S dans cette solution, et nous avons laissé réagir, à température ambiante et sous agitation magnétique, durant 3 h, 6 h et 24 h, après quoi les plaques ont été soigneusement rincées.

D.III.2.2. Validation du "capping" chimique

Nous avons ensuite greffé CouCHO sur ces 3 plaques, afin de déterminer si le capping a ou non, réussi : si nous ne détectons aucun signal de CouCHO sur les supports, nous pourrons alors en déduire que l'acide dodécanoïque a bien été greffé sur toute la surface.

Le greffage de CouCHO sur les supports a été réalisé comme décrit dans la deuxième partie (partie B, § B.V.3.1.). Pour chacune des plaques, la fluorescence a été mesurée en huit points. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 92, sur laquelle nous avons également reporté le signal d'une lame S vierge greffée avec ce même traceur.

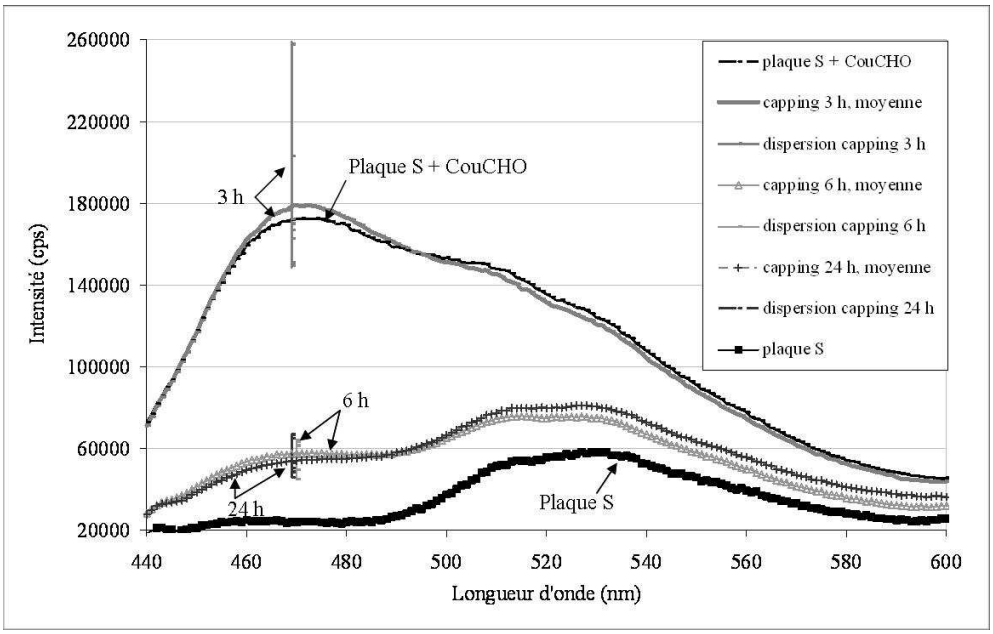


Figure 92 Protection chimique des $-NH_2$ par l'acide dodécanoïque : plaques testées avec CouCHO
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Nous avons reporté sur la figure 92 les spectres de fluorescence moyens obtenus pour chacune des trois plaques, ainsi que la dispersion autour de la valeur moyenne, mesurée au maximum de fluorescence, à 470 nm.

Après 3 h de capping, les spectres réalisés sont similaires à ceux d'une lame S vierge greffée avec CouCHO : à ce stade de la réaction, le greffage de l'acide dodécanoïque sur le support est peu visible. Le greffage est par ailleurs très inhomogène sur toute la longueur de la plaque (42 % d'écart maximum !).

Après 6 h et 24 h, on détecte encore la fluorescence de CouCHO, mais bien moins qu'après 3 h : cette fluorescence résiduelle représente 21 % après 6 h, et 19 % après 24 h. Le greffage de CouCHO sur les supports est donc réduit d'environ **80 %** lorsque le capping est réalisé avec succès, soit au bout de 6 h ; en effet, les résultats obtenus ne sont pas significativement meilleurs après 24 h. On remarque par ailleurs que dans ce cas, le signal reste faiblement dispersé : ceci indique que le greffage de l'acide dodécanoïque est homogène sur toute la surface des supports.

Nous avons renouvelé l'expérience avec d'autres lames S vierges qui ont été immergées dans le même milieu que précédemment pendant 6 h. Les résultats n'ont pas été reproductibles : le greffage du bras n'a été observé que dans un cas sur deux.

Nous avons également testé une méthode classique de protection chimique des fonctions amines décrite dans la littérature [G. Grandjean *et al.*, 2002], faisant intervenir l'anhydride acétique : les résultats obtenus n'ont pas été plus reproductibles que dans le cas précédent.

A ce stade de l'étude, nous n'avons pas d'explications permettant de justifier ces échecs, d'autant que nous sommes parvenus à acyler les supports avec d'autres composés similaires, tels que l'anhydride succinique (cf. partie E, § E.II.1.) ou les esters de succinimidyle des traceurs fluorescents.

D.IV. Conclusion

Nous avons dans un premier temps étudié la localisation des greffages à l'intérieur de puits en polymère fabriqués suivant le protocole décrit dans la troisième partie (partie C). Les deux traceurs fluorescents acides étudiés dans la partie B ont été utilisés. Les greffages localisés ont été réalisés par des dépôts à l'intérieur des puits ou par mouillage de la surface polymérisée par les solutions. Les analyses par fluorescence ont été effectuées au spectrofluorimètre et au microscope à fluorescence. Ces deux techniques sont complémentaires et renseignent bien sur la qualité et la localisation des greffages.

Nous retiendrons de cette étude que le greffage reste parfaitement localisé à l'intérieur des puits à condition de procéder par dépôt ; en effet, il semble que le polymère soit perméable aux solutions, car lorsqu'on opère par mouillage, on détecte du greffage, en faible proportion toutefois, au niveau des sites réactionnels protégés. Le greffage par dépôt a cependant pour inconvénient qu'il est réalisé sans agitation, ce qui conduit à un recouvrement inhomogène.

Les deux traceurs fluorescents acides (CiNHS et CouNHS) ont pu être greffés isolément sur une même lame, à l'intérieur d'une matrice de puits en polymère (d_{th} = 5 mm). Il nous a par ailleurs été possible d'étudier le greffage au cours du temps des deux fluorophores, dans différents puits sur un même support, et ainsi de déterminer la durée optimale de greffage pour chacun d'entre eux : le recouvrement maximum de la surface est atteint au bout de 24 h.

Concernant la méthode de localisation basée sur la fabrication de plots en polymère, nous avons pu vérifier qu'il était possible de réaliser des greffages covalents au niveau des sites protégés par le polymère, mais nous ne sommes jusqu'ici pas parvenus à mettre au point une méthode de protection chimique des sites réactionnels $-NH_2$ qui soit reproductible.

Après avoir montré qu'il était possible de réaliser des greffages covalents et localisés sur les supports, nous allons à présent procéder à leur fonctionnalisation devant permettre le

greffage orienté d'anticorps, et plus généralement de composés porteurs d'une fonction aldéhyde.

5ème partie : Partie E

E. PRÉPARATION DES SUPPORTS EN VUE DU GREFFAGE ORIENTÉ D'ANTICORPS

Introduction

Le but de cette étude consiste à proposer un modèle de support sur lequel différents anticorps pourront être greffés de façon parfaitement localisée, avec pour objectif le développement d'un biocapteur.

Nous avons dans un premier temps utilisé des molécules plus simples pour valider les techniques de localisation des greffages : comme nous venons de le décrire dans la partie précédente, des traceurs fluorescents ont été greffés par une liaison amide à l'intérieur de puits réactionnels, créés dans une matrice polymère par stéréolithographie.

Nous allons à présent fonctionnaliser les supports en vue de réaliser le greffage covalent d'anticorps. Nous avons retenu de l'étude bibliographique deux points importants concernant le greffage d'anticorps. Le premier consiste à les immobiliser par leur fragment Fc afin d'optimiser l'interaction spécifique anticorps/antigène en rendant les sites de liaisons avec l'antigène accessibles. Le second point concerne l'utilisation d'un bras espaceur, réduisant les effets d'encombrement stérique et empêchant l'adsorption des anticorps sur la surface des supports. Pour pouvoir répondre à ces exigences, nous avons choisi de fonctionnaliser les supports avec un bras espaceur de type polyoxyéthylène, terminé par une fonction aminooxy ou hydrazide permettant le greffage dans des conditions douces d'anticorps ou d'autres composés porteurs d'une fonction aldéhyde.

Après avoir présenté les stratégies envisagées pour préparer des supports fonctionnalisés, nous décrirons les différentes étapes entrant dans la synthèse du bras espaceur et nous présenterons les essais qui ont permis de confirmer l'introduction des différentes fonctions en cours de synthèse.

E.I. Préparation des supports fonctionnalisés

Pour greffer les anticorps sur les supports de telle sorte qu'ils soient correctement orientés, l'approche consistant à les immobiliser par leur fragment Fc via une liaison covalente a été retenue [Vijayendran & Leckband, 2001 ; Gering *et al.*, 2002]. Les carbohydrates présents sur ce fragment sont oxydés pour créer des fonctions aldéhyde, lesquelles vont pouvoir former des liaisons stables avec des fonctions de type amine.

Pour réaliser la synthèse du bras espaceur présentant les fonctions terminales appropriées, nous nous sommes appuyés sur les travaux réalisés par Lee et Shin (2005[a]) concernant le greffage covalent de saccharides sur des lames de verre silanisées : les fonctions aminooxy (-ONH_2) et hydrazide (–$CONHNH_2$) ont ainsi été retenues pour fixer les carbohydrates (après oxydation) sur les supports, via une chaîne de type polyoxyéthylène. Ces deux modes de fixations des anticorps sur des supports silanisés –NH_2 sont représentés sur la figure 93 :

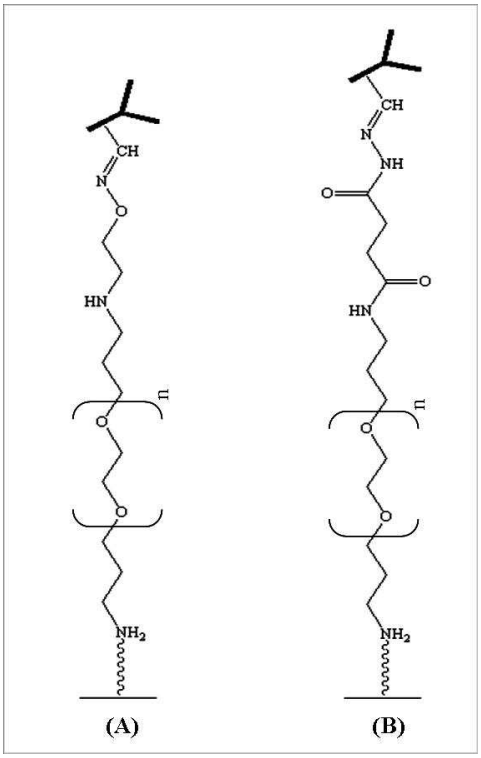


Figure 93 Bras espaceur terminé par une fonction aminooxy (A) ou hydrazide (B) Greffage des anticorps sur les supports par les carbohydrates du fragment Fc

E.I.1. Synthèse du bras espaceur terminé par les fonctions aminooxy ou hydrazide

Le composé majeur qui entre dans la constitution du bras espaceur est une courte chaîne de type polyoxyéthylène : il s'agit de la 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (Figure 94), notée dans la suite NH_2-POE-NH_2.

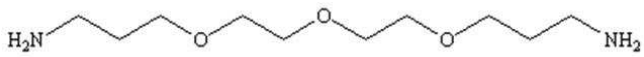


Figure 94 Structure de la 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (NH_2-POE-NH_2)

Son greffage sur les supports aminés nécessite d'introduire sur ces derniers une fonction acide activée sous forme d'ester de succinimidyle.

La fonctionnalisation terminale de ce bras procède par deux chemins réactionnels différents :

- L'introduction de la fonction aminooxy fait intervenir une alkylation de la fonction amine par le N-(2-bromoéthoxy)phtalimide (BE-Pht) suivie du déblocage du groupement phtalimide (Pht).

- L'introduction de la fonction hydrazide requiert plusieurs étapes : on commence par introduire sur le bras diamino une fonction acide activée sous forme d'ester de succinimidyle, sur laquelle on fait ensuite réagir le *tert*-butyl carbazate (Boc-$NHNH_2$). Pour terminer, le groupement butoxycarbonyle (Boc) est débloqué.

Le schéma général de la synthèse du bras espaceur est présenté sur la figure 95.

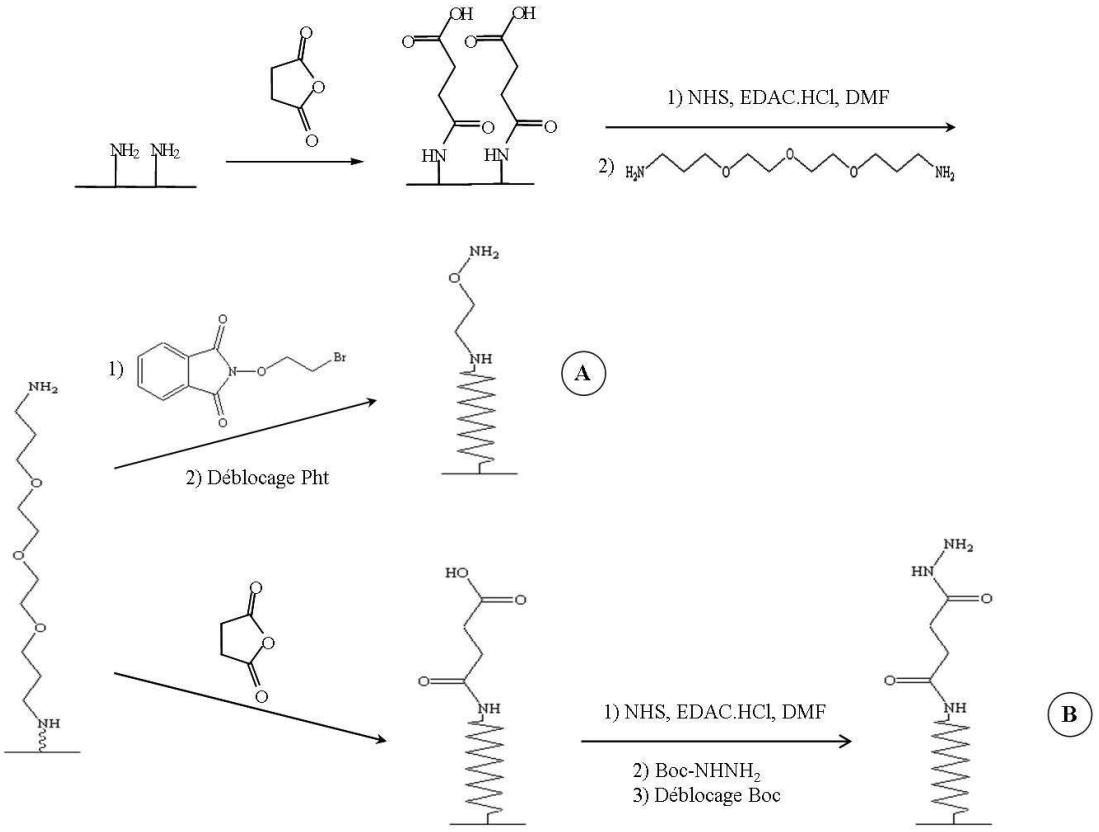


Figure 95 Synthèse du bras espaceur terminé par une fonction aminooxy (A) ou hydrazide (B)

Pour valider ces différentes étapes, nous avons réalisé des essais de greffage de composés fluorescents sur les différentes fonctions nouvellement introduites sur les supports.

E.I.2. Validation des différentes étapes entrant dans la synthèse du bras espaceur

Chaque fois que cela était possible, nous avons contrôlé les résultats obtenus à l'issue des différentes étapes: de manière générale, nous avons greffé CouCHO sur les groupements de type amino (fonction amine du bras espaceur, fonction aminooxy et fonction hydrazide) et un nouveau traceur fluorescent terminé par une fonction hydrazide sur les fonctions acide activées sous forme d'esters de succinimidyle.

Il s'agit d'un dérivé coumarine terminé par une fonction hydrazide, la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxyhydrazine, noté CouCONHNH$_2$ (Figure 96).

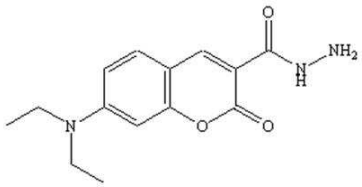


Figure 96 Structure de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxyhydrazine ($CouCONHNH_2$)

Ce composé est obtenu par condensation entre le *tert*-butyl carbazate et CouCOOH, suivie du déblocage du groupement Boc [Lin *et al.*, 2000].

Nous allons maintenant décrire les différentes étapes permettant de préparer des supports fonctionnalisés et présenter les résultats obtenus à l'issue du greffage des traceurs fluorescents CouCHO et $CouCONHNH_2$ sur les différentes fonctions introduites en cours de synthèse.

E.II. Greffage du bras espaceur diamino sur les lames S

Le greffage sur les supports aminés du bras espaceur homobifonctionnel de type polyoxyéthylène nécessite 3 étapes :

1- L'introduction d'une fonction acide carboxylique sur les supports.
2- L'activation de cette fonction acide sous forme d'ester de succinimidyle.
3- Le greffage du bras NH_2-POE-NH_2 par une liaison amide.

E.II.1. Introduction sur les supports d'une fonction acide activée sous forme d'ester de succinimidyle

E.II.1.1. Action de l'anhydride succinique sur les lames silanisées –NH_2

Pour introduire la fonction acide carboxylique sur les lames S, nous avons appliqué le protocole décrit par Lee et Shin (2005[a]) utilisant l'ouverture nucléophile du cycle de l'anhydride succinique par la fonction amine. Pour ce faire, les plaques sont immergées pendant 3 h dans une solution à 3 % d'anhydride succinique dans le DMF, sous agitation magnétique et à température ambiante.

Le schéma de cette réaction est rappelé sur la figure 97 :

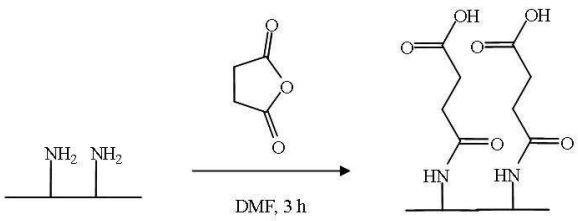


Figure 97 Action de l'anhydride succinique sur les lames silanisées

Les plaques sont ensuite rincées avec du DMF avant d'être activées par le N-hydroxysuccinimide.

E.II.1.2. Activation de la fonction acide sous forme d'ester de succinimidyle

Pour activer les fonctions acide par le NHS, nous n'avons pas appliqué le protocole décrit par Lee et Shin mais nous avons procédé comme auparavant (cf. partie B, § B.IV.1.1.), c'est-à-dire que nous avons utilisé l'EDAC.HCl plutôt que le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) préconisé par les auteurs. La réaction est conduite dans le DMF anhydre : les plaques –COOH sont immergées 24 h dans cette solution, sous agitation magnétique et à température ambiante, après quoi elles sont rincées avec du DMF puis séchées.

Deux plaques –COONHS ont alors été testées : sur l'une, nous avons greffé CouCHO, et sur l'autre, le composé $CouCONHNH_2$.

E.II.1.3. Caractérisation des supports activés par une fonction ester de succinimidyle

E.II.1.3.a Greffage de CouCHO sur une plaque –COONHS

Nous attendons un résultat négatif avec ce traceur, étant donné qu'il ne possède pas de fonctions lui permettant de former une liaison covalente avec un acide activé par le NHS. Le greffage a été réalisé comme décrit dans la partie B ; les spectres de fluorescence mesurés en six points le long de la plaque sont présentés ci-après :

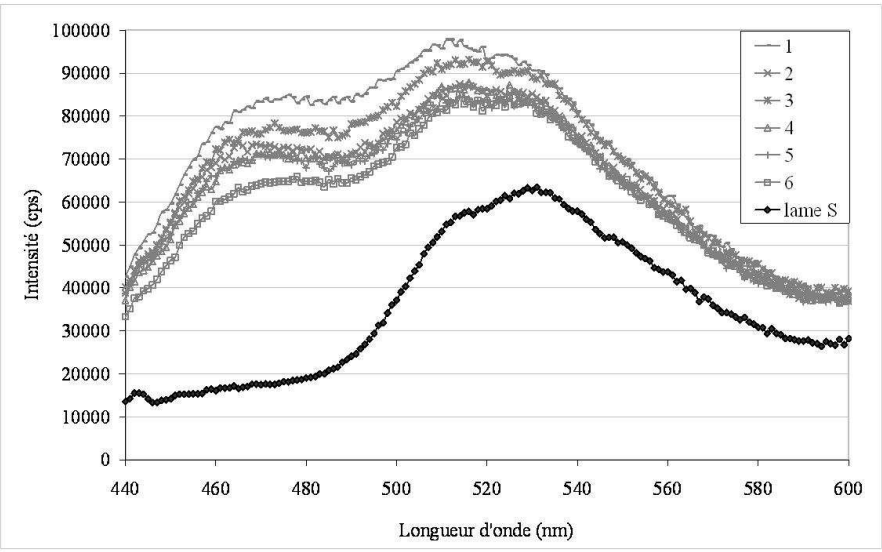


Figure 98 Plaque -COONHS testée avec CouCHO - spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

On observe un signal de fluorescence caractéristique de CouCHO greffé sur la surface des supports, c'est-à-dire centré autour de 470 nm ; l'intensité reste cependant faible si on compare ces résultats à ceux obtenus lorsque le greffage est directement réalisé sur une lame S vierge (Tableau 13).

Mesure	Intensité à 470 nm (cps)
1	83 274
2	73 199
3	75 965
4	71 194
5	71 032
6	64 273
Moyenne	**73 156**
Lame S	*19 770*
Moyenne plaque S vierge greffée avec CouCHO	**284 536**
-NH_2 résiduels (%)	**20,2**

Tableau 13 Plaque –COONHS greffée avec CouCHO : intensité mesurée à 470 nm à l'émission Comparaison avec une plaque S greffée avec CouCHO (cf. partie B, § B.III.3.2.c.1)

Nous pouvons déduire de ces résultats que le recouvrement surfacique ne correspond pas à celui d'une plaque S, puisqu'on observe ici beaucoup moins de signal (≈ 80 % en moins) : environ 20 % des $–NH_2$ initialement présents subsistent sur le support (valeurs calculées après déduction du signal de la plaque). Puisque le recouvrement surfacique a été modifié, cela signifie qu'au minimum, la 1ère étape correspondant au greffage de l'anhydride succinique sur les lames a été réalisée avec succès.

A ce stade, nous ne sommes pas encore en mesure de déterminer si la réaction d'activation par le NHS s'est déroulée dans de bonnes conditions : quelle proportion des sites acylés dans l'étape précédente a été activée par le NHS ?

E.II.1.3.b Greffage de $CouCONHNH_2$ sur une plaque -COONHS

Nous allons à présent déterminer quels sont les résultats obtenus après activation de la fonction acide par le NHS. Pour ce faire, nous avons greffé le composé $CouCONHNH_2$ nouvellement synthétisé sur une plaque –COONHS. Nous avons procédé de la même manière

que pour réaliser le greffage des traceurs fluorescents Fl^*-COONHS sur les supports $-NH_2$: $CouCONHNH_2$ est dissous dans le minimum de DMF et le greffage est réalisé dans une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5. On laisse réagir 4 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi la plaque est soigneusement rincée.

Après avoir au préalable déterminé les maxima à l'émission ($\lambda_{ém}$) et à l'excitation (λ_{exc}) pour ce nouveau traceur, la fluorescence a été mesurée sur toute la longueur de la plaque en 6 points. Les résultats obtenus sont présentés ci-après :

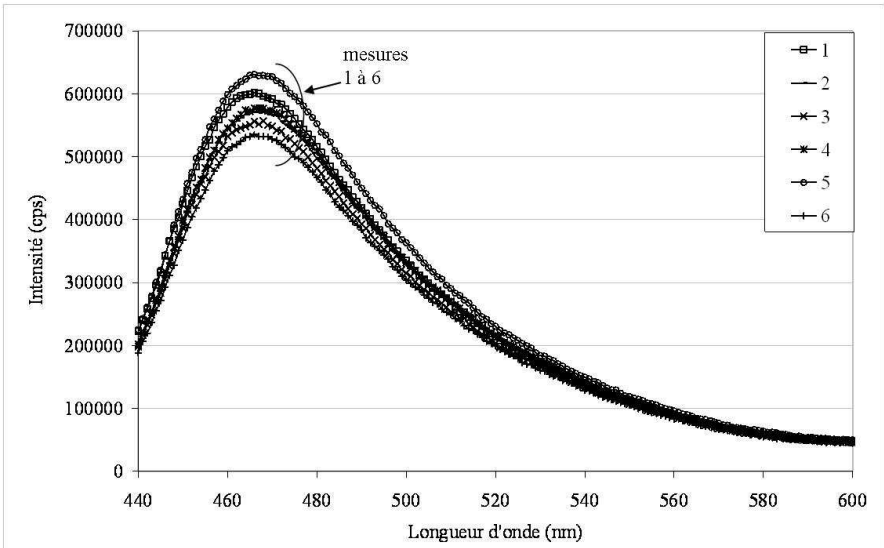


Figure 99 Plaque -COONHS testée avec $CouCONHNH_2$ - spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 430 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Le maximum de fluorescence est observé à **467 nm** pour une excitation à **430 nm**. On remarque une dispersion des maxima de l'ordre de 15 %, ce qui indique que le greffage est assez homogène sur toute la longueur de la plaque.

Etant donné que nous sommes parvenu à greffer le composé $CouCONHNH_2$ sur les plaques, nous en déduisons que les réactions mises en œuvre, à savoir d'une part l'acylation des fonctions amine, et d'autre part, l'activation des fonctions acide par le NHS, ont réussi.

E.II.2. Greffage du composé NH_2-POE-NH_2 sur les supports activés –COONHS

Le greffage du bras espaceur diamino sur les supports est réalisé en immergeant les plaques –COONHS dans une solution de NH_2-POE-NH_2 à 3 % dans le DMF [Lee & Shin, 2005[a]].
Le schéma de la réaction est rappelé sur la figure 100 :

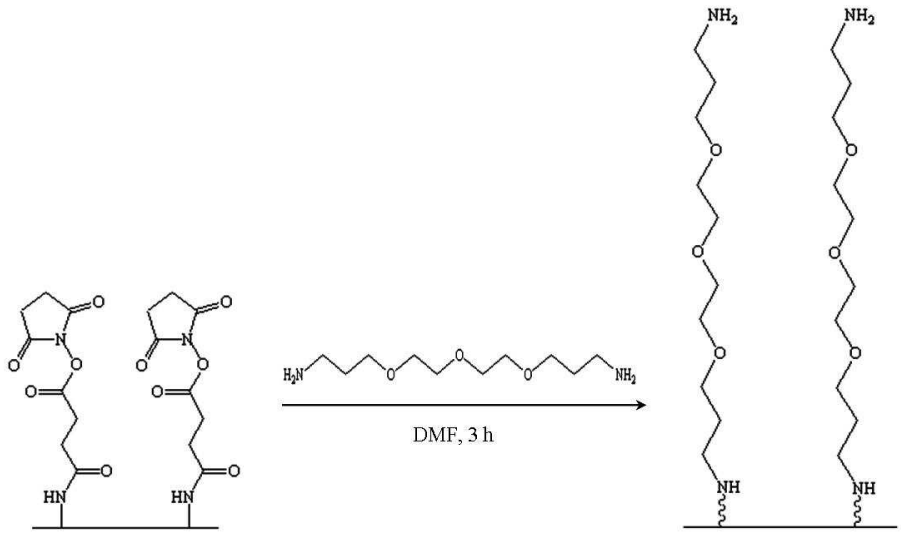


Figure 100 Greffage de NH_2-POE-NH_2 sur les plaques –COONHS

On laisse réagir 3 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi les lames sont rincées avec du DMF puis séchées.

Pour vérifier la présence des fonctions amine confirmant le greffage du bras espaceur, nous avons alors fait réagir le composé CouCHO sur l'une de ces plaques. Huit mesures de fluorescence ont été réalisées sur toute la longueur de la lame, mais pour ne pas surcharger les graphes, nous ne présenterons que les résultats obtenus en deux points (courbes extrêmes). Pour pouvoir établir une comparaison avec une référence, nous avons également reporté sur la figure 101 les spectres d'une plaque S vierge greffée avec CouCHO (deux mesures).
Les courbes présentées ci-après ont été obtenues après soustraction du signal de la plaque.

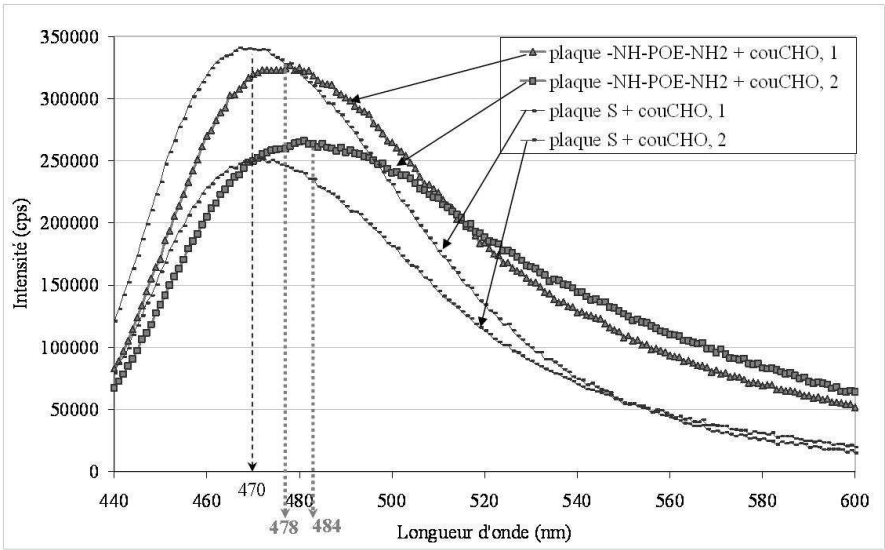


Figure 101 Plaque –NH-POE-NH_2 et plaque S testées avec CouCHO
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Alors qu'à l'issue de l'étape précédente nous n'avions détecté que faiblement la fluorescence de CouCHO (cf. E.II.1.3.a.), ce qui était par ailleurs attendu puisque les fonctions amine avaient été acylées, on observe cette fois-ci un important signal. Cela signifie que le recouvrement surfacique est bien de type amino, autrement dit, le greffage du bras NH_2-POE-NH_2 sur les lames –COONHS a été réalisé avec succès.

On remarque par ailleurs que les spectres sont plus larges et que les maxima à l'émission sont décalés par rapport à ceux d'une plaque S vierge greffée avec CouCHO. La fluorescence est observée à une plus grande longueur d'onde ($\lambda_{ém}$ > 470 nm), ce qui peut s'expliquer de la façon suivante : la flexibilité du bras espaceur, via lequel les molécules sont greffées sur les supports, confère à ce système des propriétés qui se rapprochent d'un milieu liquide, d'où un déplacement de l'émission de fluorescence vers les grandes longueurs d'ondes.

On constate également que la fluorescence est soumise à un effet de concentration : $\lambda_{ém}$ augmente lorsque l'intensité, c'est à dire la densité du greffage, diminue. Plus les molécules sont éloignées les unes des autres, et plus on tend vers le comportement en solution diluée (du fait de la présence du bras espaceur, on peut d'autant mieux faire cette analogie), ce qui implique qu'on observe la fluorescence à une plus grande longueur d'onde

Les courbes correspondant aux 6 autres mesures réalisées sur la plaque ont été jointes en annexe (cf. Annexe 6): on observe un écart maximum de 20 % entre les différentes mesures et on remarque que les maxima à l'émission sont compris entre 478 et 484 nm (effet de concentration).

Nous retiendrons principalement de l'ensemble de ces résultats que, du fait qu'on observe la fluorescence de CouCHO greffé sur les supports, nous pouvons conclure que le greffage du bras espaceur diamino sur les plaques -COONHS est réussi.

E.III. Fonctionnalisation du bras espaceur

Nous allons à présent introduire sur le bras espaceur de type polyoxyéthylène les fonctions terminales permettant la fixation covalente de composés porteurs d'une fonction aldéhyde, via une liaison stable de type oxime ou hydrazone.

E.III.1. Introduction de la fonction aminooxy

Pour introduire la fonction aminooxy à l'extrémité du bras espaceur, nous avons appliqué le protocole décrit par Lee et Shin (2005[a]) qui consiste à faire réagir le N-(2-bromoéthoxy)phtalimide sur les plaques -NH-POE-NH_2, puis celui décrit par Canne *et al.* (1996) pour ensuite débloquer le groupement phtalimide. Le schéma général de cette réaction est représenté sur la figure 102 :

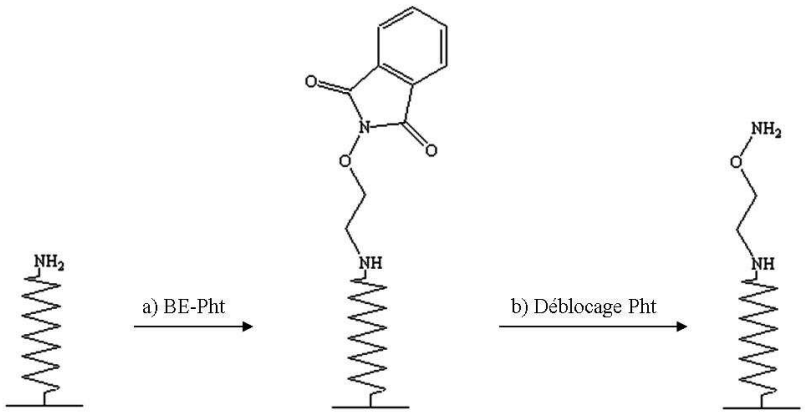


Figure 102 Introduction d'une fonction aminooxy sur les supports greffés avec le bras NH_2-POE-NH_2

Le greffage du composé BE-Pht sur les supports -NH-POE-NH_2 est réalisé dans le DMF en présence de triéthylamine.

Le déblocage du groupement phtalimide se fait en deux temps (Figure 103) : (1) le phtalimide est d'abord réduit partiellement par $NaBH_4$ en milieu isopropanol/eau, (2) la

fonction aminooxy est ensuite libérée après cyclisation du phtalide en présence d'acide acétique [Canne *et al.*, 1996 ; Osby *et al.*, 1984].

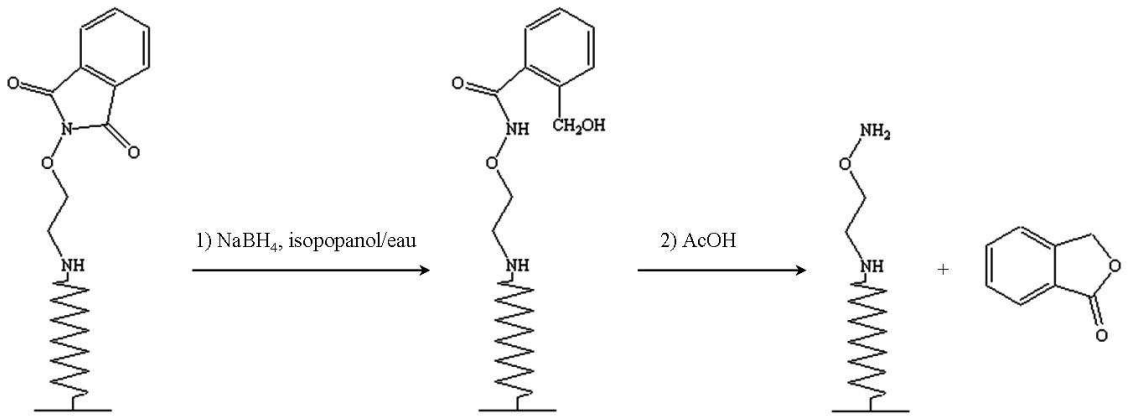


Figure 103 Déprotection de la fonction aminooxy sur les plaques –NH-POE-NH_2 greffées avec BE-Pht [Osby *et al.*, 1984]

Nous avons alors testé ce support (-NH-Et-ONH_2) avec le composé aldéhydique CouCHO. Sept mesures de fluorescence ont été réalisées sur toute la longueur de la plaque (Figure 104). Nous avons également reporté sur cette figure le spectre d'une lame S vierge greffée avec ce même traceur.

Toutes les courbes présentées ci-après ont été obtenues après soustraction du signal de la plaque.

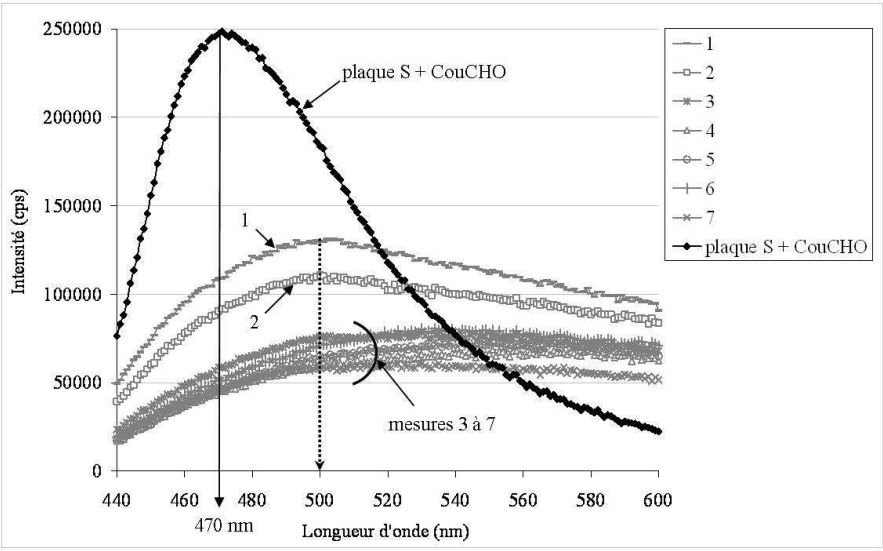


Figure 104 Plaque greffée avec le bras espaceur terminé par une fonction aminooxy et plaque S testées avec CouCHO - spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

On observe sur le support fonctionnalisé un signal de fluorescence très large, pour lequel il est difficile de déterminer un maximum, bien qu'il semble néanmoins se situer au-delà de 500 nm. Le signal est globalement homogène à l'exception des deux premiers points (mesures 1 et 2). Les spectres sont très différents de ceux d'une plaque S greffée avec CouCHO et l'intensité est par ailleurs bien plus faible. Cependant, ce signal correspond bien à du greffage: en effet, les supports fonctionnalisés présentent la même fluorescence intrinsèque que les lames S vierges (cf. Annexe 7). Ces résultats sont en outre différents de ceux obtenus dans le cas d'une plaque –NH-POE-NH_2 testée avec CouCHO (cf. E.II.2.). Nous pouvons déduire de ces observations que les supports greffés avec le bras espaceur sont fonctionnalisés différemment, puisqu'on ne retrouve pas le signal obtenu à l'issue de l'étape précédente, et que les fonctions terminales nouvellement créées permettent de fixer le traceur fluorescent aldéhydique CouCHO : c'est donc que la fonction aminooxy a bien été introduite à l'extrémité du bras espaceur diamino. La fluorescence observée reste cependant peu intense, laissant supposer que le recouvrement surfacique est faible. Cela signifie que le rendement de la réaction de déprotection de la fonction aminooxy est faible en phase hétérogène (alors qu'il se situe entre 70 et 97 % en solution [Canne *et al.*, 1996 ; Osby *et al.*, 1984]).

E.III.2. Introduction de la fonction hydrazide

O' Shannessy *et al.* (1988, 1990) ont été parmi les premiers à greffer des anticorps par les carbohydrates du fragment Fc (après oxydation) sur la silice via une liaison hydrazone stable, pour des applications en chromatographie d'affinité. La fonction hydrazide est depuis très souvent retenue pour fixer des anticorps oxydés par une liaison covalente sur différents types de supports [Arenkov *et al.*, 2000 ; Vijayendran & Leckband, 2001 ; Gering *et al.*, 2002 ; etc.].

Pour introduire cette fonction sur les lames S, nous avons commencé par faire réagir l'anhydride succinique sur le bras espaceur diamino ; après activation de l'acide carboxylique par le NHS, nous avons procédé au greffage du *tert*-butyl carbazate, suivi du déblocage du groupement Boc (Figure 105). Nous avons préféré ce dérivé monoprotégé à l'hydrazine, afin d'éviter la biscondensation sur deux fonctions carboxyliques voisines.

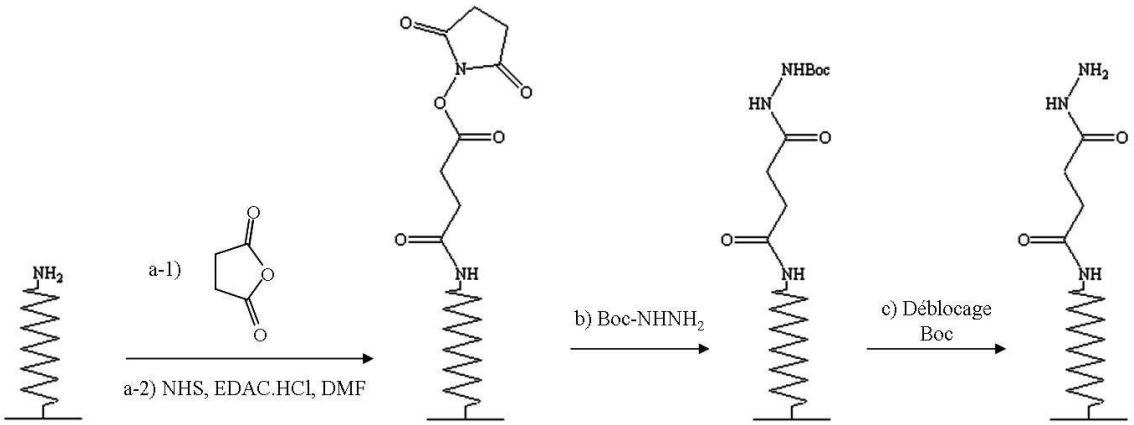


Figure 105 Introduction d'une fonction hydrazide sur les supports greffés avec le bras NH_2-POE-NH_2

E.III.2.1. Introduction sur le bras espaceur d'une fonction acide carboxylique activée sous forme d'ester de succinimidyle

L'introduction sur le bras espaceur de la fonction acide carboxylique et son activation sous forme d'ester de succinimidyle ont été réalisées en suivant les conditions décrites au paragraphe II.1.

Nous avons alors fait réagir le composé $CouCONHNH_2$ sur une de ces plaques (–NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2COONHS$). Sept mesures de fluorescence ont été réalisées sur toute la longueur de la lame (Figure 106).

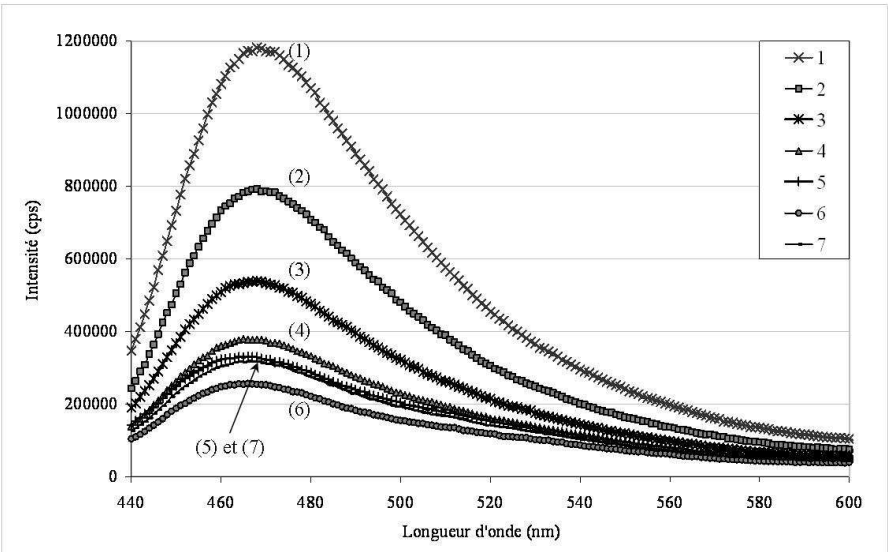


Figure 106 Plaque –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2COONHS$ testée avec $CouCONHNH_2$
Spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 430 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Du fait qu'on observe la fluorescence de $CouCONHNH_2$ greffé sur le support, nous pouvons conclure que le recouvrement surfacique est bien de type –COONHS. Par contre, le greffage est cette fois-ci très inhomogène : on observe jusque 78 % d'écart entre les mesures (1) et (6) ! A mesure qu'on introduit des étapes supplémentaires dans la synthèse du bras espaceur, on peut s'attendre à ce qu'au niveau du recouvrement surfacique, on perde à la fois en densité de greffage et en homogénéité. Ce résultat mérite néanmoins d'être confirmé par d'autres essais.

E.III.2.2. Introduction et caractérisation de la fonction hydrazide en bout de bras espaceur

E.III.2.2.a Greffage du *tert*-butyl carbazate sur les plaques –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2$COONHS

Etant donné qu'on envisage de former une liaison amide entre un composé terminé par une fonction amine (le *tert*-butyl carbazate) et un support de type –COONHS, nous avons appliqué le protocole développé pour la réalisation des greffages covalents des traceurs fluorescents acides du type Fl^*-COONHS sur les plaques $–NH_2$: le *tert*-butyl carbazate est dissous dans le minimum de DMF et la réaction est conduite dans une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5. On laisse réagir 18 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi les plaques sont soigneusement rincées avec du DMF.

E.III.2.2.b Déprotection de la fonction hydrazide

Le déblocage du groupement Boc est souvent réalisé dans des conditions acides fortes (TFA [Kaneko *et al.*, 1991], HCl/AcOEt [Gibson *et al.*, 1994]) ; nous avons préféré utiliser le protocole appliqué sur des acides aminés décrit par Lin *et al.* (2000).
La réaction de déblocage a été réalisée sur un quart de plaque dans l'acétate de *tert*-butyle (AcOtBu) en présence d'une quantité stoechiométrique d'acide sulfurique concentré. On laisse réagir 19 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi la plaque est rincée avec de l'acétate d'éthyle, puis neutralisée 1 h en milieu basique (TEA/CH_2Cl_2).

E.III.2.2.c Caractérisation des supports terminés par une fonction hydrazide

La fonction terminale hydrazide doit permettre la formation d'une liaison stable de type hydrazone avec une molécule possédant une fonction aldéhyde : nous avons alors testé ce support avec le dérivé coumarinique CouCHO. Etant donné que le greffage n'a été réalisé que sur un quart de plaque, nous n'avons pu effectuer que 3 mesures de fluorescence (notées 1, 2 et 3 sur la figure 107). Nous avons reporté sur le même graphe les spectres d'une plaque S et d'une plaque fonctionnalisée par le bras espaceur diamino (–NH-POE-NH_2), greffées avec CouCHO.

Pour toutes les courbes présentées ci-après, le signal de la plaque a été soustrait.

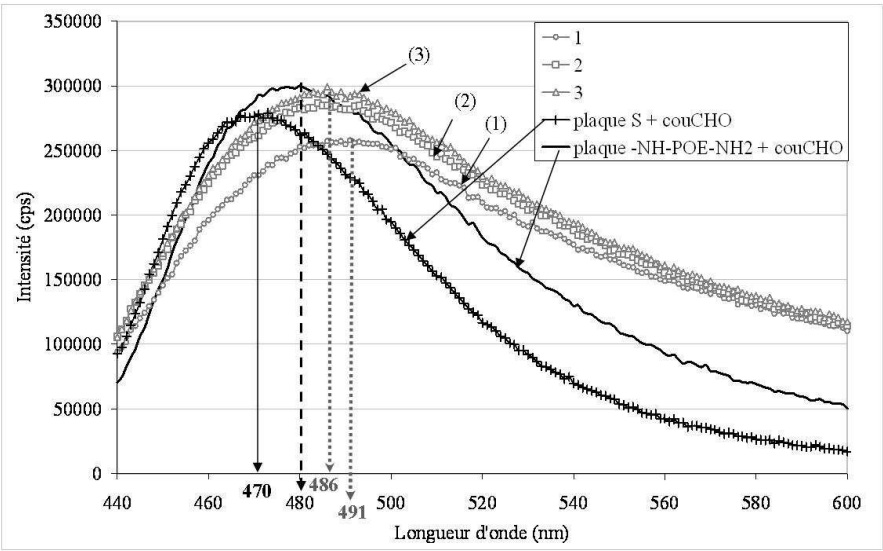


Figure 107 Plaque greffée avec le bras espaceur terminé par une fonction hydrazide et testée avec CouCHO - spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Le fait qu'on détecte la fluorescence de CouCHO indique que le recouvrement est bien de type amino et confirme plus précisément l'existence des fonctions hydrazide, puisque toutes les étapes réalisées en amont ont été validées. Les spectres obtenus sont dans ce cas particulièrement larges, et on constate que les maxima sont décalés vers les grandes longueurs d'onde par rapport à ceux d'une plaque –NH-POE-NH_2 greffée avec CouCHO (et davantage encore par rapport au cas d'une plaque S greffée avec CouCHO) : $486 < \lambda_{ém} < 491$ nm (effet de concentration). Comme précédemment (cf. E.II.2.), ceci s'explique par l'introduction du bras espaceur entre le support et le rotor fluorescent, ce bras ayant de surcroît été rallongé (action de l'anhydride succinique sur le bras diamino).

Nous déduisons de l'ensemble de ces résultats que la fonctionnalisation des lames S par un bras espaceur de type polyoxyéthylène terminé par une fonction hydrazide est réussie, et qu'il est possible d'y greffer une molécule possédant une fonction aldéhyde, via une liaison covalente stable de type hydrazone.

E.IV. Partie expérimentale

E.IV.1. Matériels et méthodes

Produits chimiques :

Les spécifications des produits et solvants utilisés sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Produit	Formule brute	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Fournisseur	Référence
Réactifs				
Acide acétique	$C_2H_4O_2$	60,05	Aldrich	10,908-8
Acide chlorhydrique	HCl	36,45	Acros Organics	124630010
Acide sulfurique	H_2SO_4	98,07	Sds	1030022
Anhydride succinique	$C_4H_4O_3$	100,07	Aldrich	13,441-4
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	84,01	Acros Organics	217225000
Borohydrure de sodium	$NaBH_4$	37,83	Aldrich	45,288-2
tert-Butyl carbazate	$C_5H_{12}N_2O_2$	132,16	Fluka	19740
Carbonate de potassium	K_2CO_3	138,21	Aldrich	31,026-3
Chlorhydrate de 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide	$C_8H_{17}N_3$	191,71	Sigma	E7750
Chlorure de sodium	NaCl	58,44	Prolabo	27800.291
1,2-Dibromoéthane	$C_2H_4Br_2$	187,87	Aldrich	D4,075-2
N-Hydroxyphtalimide	$C_8H_5NO_3$	163,13	Aldrich	H53704
N-Hydroxysuccinimide	$C_4H_5NO_3$	115,90	Aldrich	13,067-2
N-Hydroxybenzotriazole	$C_6H_5NO_3$	135,13	Avocado	2592-95-2
Oxyde d'aluminium activé	Al_2O_3	101,96	Aldrich	19,944-3
Sulfate de magnésium anhydre	$MgSO_4$	120,37	Prolabo	25162.361
Triéthylamine	$C_6H_{15}N$	101,19	Fluka	90340
4,7,10-Trioxa-1,13-tridécanediamine	$C_{10}H_{24}N_2O_3$	220,31	Fluka	92892
Solvants				
Acétate de *tert*-butyle	$C_6H_{12}O_2$	116,16	Aldrich	B8,820-9
Acétate d'éthyle	$C_4H_8O_2$	88,11	Sds	0023721
Acétonitrile	C_2H_3N	41,05	Carlo Erba	412412
Dichlorométhane	CH_2Cl_2	84,93	Carlo Erba	528372
Diéthyléther	$C_4H_{10}O$	74,12	Sds	0440221
Diméthylformamide	C_3H_7NO	73,10	Fluka	40250
Ethanol absolu	C_2H_6O	46,07	Carlo Erba	528131
Isopropanol	C_3H_8O	60,1	Acros Organics	423830010

Les méthodes employées sont similaires à celles décrites dans la deuxième partie.

E.IV.2. Description des différentes étapes entrant dans la synthèse du bras espaceur

E.IV.2.1. Greffage de l'anhydride succinique sur les supports $–NH_2$ et –NH-POE-NH_2

Nous avons préparé 60 mL d'une solution à 3 % mass. d'anhydride succinique (1,708 g, 17,1 mmol) dans le DMF préalablement séché. Les plaques terminées par une fonction amine ($–NH_2$ et –NH-POE-NH_2) sont immergées dans cette solution durant 3 h, sous agitation magnétique et à température ambiante, après quoi elles sont abondamment rincées avec du DMF puis séchées.

E.IV.2.2. Activation de la fonction acide carboxylique par le NHS

Le NHS (0,139 g, 1,2 mmol) et l'EDAC.HCl (0,230 g, 1,2 mmol) sont dissous dans 60 mL de DMF anhydre. Les plaques terminées par une fonction acide carboxylique sont immergées dans cette solution durant 24 h, sous agitation magnétique et à température ambiante, après quoi elles sont abondamment rincées avec du DMF puis séchées.

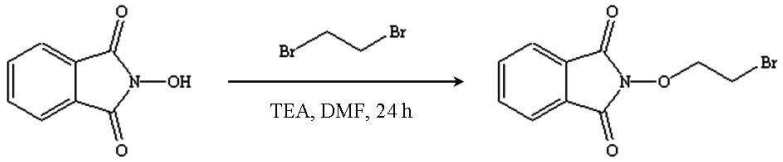
E.IV.2.3. Greffage du bras espaceur diamino sur les plaques –COONHS

Nous avons préparé 60 mL d'une solution à 3 % mass. de 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine (1,697 mL, 7,7 mmol) dans le DMF. Les plaques –COONHS sont immergées dans cette solution durant 3 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi elles sont abondamment rincées avec du DMF puis séchées.

E.IV.2.4. Greffage du composé BE-Pht sur les supports -NH-POE-NH_2 et déblocage du groupement Pht

E.IV.2.4.a Synthèse du N-(2-bromoéthoxy)phtalimide (BE-Pht)

Le protocole qui a été suivi correspond à celui décrit par Canne *et al.* (1996) : on fait réagir le N-hydroxyphtalimide avec le 1,2-dibromoéthane qui est introduit avec un large excès.



Le N-hydroxyphtalimide (1,600 g, 9,8 mmol) est dissous dans 11,5 mL de DMF. La triéthylamine (3 mL, 21,5 mmol) est alors ajoutée et le 1,2-dibromoéthane est introduit avec un large excès (3,5 mL, 40,6 mmol). On laisse réagir 24 h, à température ambiante et sous agitation magnétique, après quoi les solides sont filtrés puis lavés avec du DMF ; le filtrat est quant à lui dilué dans l'eau : le précipité nouvellement formé est filtré puis dissous dans de l'acétate d'éthyle. Cette solution est neutralisée avec de l'acide chlorhydrique (1 N), lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, puis concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu est recristallisé dans l'éthanol (1,646 g, 6,1 mmol, 62 %).

Formule brute: $C_{10}H_8NO_3Br$
M = 270 $g.mol^{-1}$
PF = 99 °C ; Litt. : 94-96 °C [Bauer & Suresh, 1963]

E.IV.2.4.b Greffage du composé BE-Pht sur les plaques -NH-POE-NH_2

Le N-(2-bromoéthoxy)phtalimide (1,138 g, 4,2 mmol, 3 % mass.) est dissous dans 40 mL de DMF, après quoi la triéthylamine est ajoutée (1,57 mL, 11,3 mmol, 3 % mass.). Les plaques -NH-POE-NH_2 sont immergées 18 h dans cette solution, sous agitation magnétique et à température ambiante. Elles sont ensuite soigneusement rincées dans du DMF puis séchées.

E.IV.2.4.c Déprotection de la fonction aminooxy

Le borohydrure de sodium (0,300 g, 7,9 mmol) est dissous dans 20 mL d'un mélange isopropanol/eau (17/3, v/v). La plaque greffée avec BE-Pht est immergée dans cette solution toute une nuit, à température ambiante et sous agitation magnétique. L'acide acétique (2,15 mL, 37,2 mmol) est alors ajouté goutte à goutte et la solution est complétée avec 20 mL d'un

mélange isopropanol/eau (17/3, v/v). On laisse réagir 2 h, à 50 °C et sous agitation magnétique, après quoi la plaque est rincée plusieurs heures dans de l'eau distillée puis séchée.

E.IV.2.5. Greffage du *tert*-butyl carbazate sur les supports –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2COONHS$ et déblocage du groupement Boc

E.IV.2.5.a Greffage du *tert*-butyl carbazate sur les supports –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2COONHS$

Le *tert*-butyl carbazate (0,158 g, 1,2 mmol) est dissous dans 3 mL de DMF complétés à 60 mL par une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5. Les plaques –NH-POE-NH-$CO(CH_2)_2COONHS$ sont immergées 21 h dans cette solution, sous agitation magnétique et à température ambiante, après quoi elles sont rincées 4 h dans du dichlorométhane puis séchées.

E.IV.2.5.b Déprotection de la fonction hydrazide

Le groupement Boc est débloqué dans 10 mL d'acétate de *tert*-butyle en présence d'acide sulfurique concentré (36 N, 0,034 mL, 0,64 mmol). Les plaques greffées avec le *tert*-butyl carbazate sont immergées 19 h dans cette solution, sous agitation magnétique et à température ambiante, après quoi elles sont rincées avec de l'acétate d'éthyle.
L'ammonium est ensuite neutralisé dans une solution de triéthylamine (0,3 mL) dans le dichlorométhane (10 mL). On laisse réagir 1 h sous agitation magnétique, après quoi les plaques sont rincées 2 h dans du dichlorométhane puis séchées.

E.IV.3. Greffage des traceurs fluorescents CouCHO et $CouCONHNH_2$ sur les supports fonctionnalisés

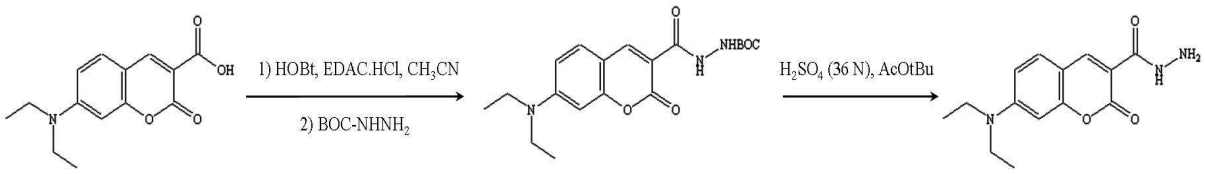
E.IV.3.1. Greffage du composé CouCHO sur les supports aminés

Pour le greffage comme pour les rinçages, nous avons appliqué strictement le même protocole que celui décrit en deuxième partie (partie B). CouCHO est dissous dans l'éthanol et l'acide acétique est introduit en quantité catalytique (0,16 % vol.). Les plaques sont immergées 4 h dans cette solution, à 50°C et sous agitation magnétique, après quoi elles sont soigneusement rincées (3 h dans l'éthanol, puis 2 h dans le dichlorométhane).

E.IV.3.2. Greffage du composé $CouCONHNH_2$ sur les supports de type -COONHS

E.IV.3.2.a Synthèse du traceur fluorescent $CouCONHNH_2$

On fait réagir le *tert*-butyl carbazate avec le composé de départ CouCOOH, en procédant dans la même étape à l'activation de la fonction acide par le N-hydroxybenzotriazole (HOBt) en présence d'EDAC.HCl. Le produit $CouCONHNH_2$ est obtenu après déblocage du groupement Boc, dans l'acétate de *tert*-butyle en présence d'acide sulfurique concentré.



1ère étape : Synthèse de CouCONHNHBoc

L'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique (0,783 g, 3 mmol) est dissous dans 2 mL de CH_3CN, après quoi le HOBt est ajouté (0,486 g, 3,6 mmol, 1,2 éq.), puis l'EDAC.HCl (0,690 g, 3,6 mmol, 1,2 éq.), introduit en plusieurs fois. On laisse réagir 1 h à température ambiante, puis on ajoute le *tert*-butyl carbazate (0,396 g, 3 mmol, 1 éq.) préalablement dissous dans 4 mL de CH_3CN. On laisse encore réagir 5 h, à température

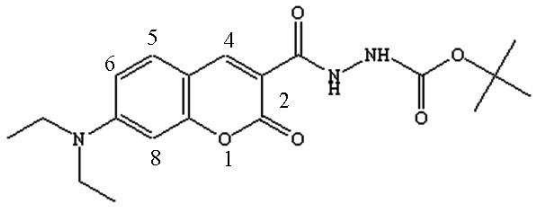
ambiante et sous agitation magnétique. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : EtOH/CH_2Cl_2, 2/98, v/v).

Après addition d'eau, le produit brut est extrait plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de carbonate de potassium et une solution saturée de chlorure de sodium. Elle est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, puis évaporée sous pression réduite ; les cristaux sont enfin lavés avec de l'éther (0,888 g, 2,4 mmol, 79 %).

Formule brute: $C_{19}H_{25}N_3O_5$

M = 375 $g.mol^{-1}$

PF = 202-203 °C



RMN ^1H ($CDCl_3$)

1,25 (6H, t, -N($CH_2C\mathbf{H_3}$)$_2$), J = 7 Hz

1,50 (9H, s, -OtBu)

3,47 (4H, q, -N($C\mathbf{H_2}CH_3$)$_2$), J = 7 Hz

6,54 (1H, s, H8)

6,64 (1H, m, -CON**H**)

6,69 (1H, dd, H6), J = 9 Hz

7,44 (1H, d, H5), J = 9 Hz

8,69 (1H, s, H4)

10,22 (1H, d, -N**H**COOtBu)

<u>2ème étape</u> : Déblocage du groupement Boc

Le déblocage du groupement Boc est réalisé suivant un protocole décrit par Lin *et al.* (2000). Une fraction du composé CouCONHNHBoc précédemment synthétisé (0,050 g, 0,13 mmol) est dissoute dans 5 mL d'acétate de *tert*-butyle en présence d'acide sulfurique concentré (0,017 mL, 0,32 mmol). On laisse réagir 7 h, à température ambiante et sous agitation magnétique. La réaction est suivie par CCM (éluant: EtOH/CH_2Cl_2, 5/95, v/v).

Le produit formé a précipité : il est filtré, dissous dans un mélange eau/éthanol ensuite neutralisé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium ; le brut réactionnel est extrait avec du dichlorométhane, séché sur $MgSO_4$, filtré, puis évaporé sous pression réduite. On récupère 41 mg d'un produit cristallisé (rendement supérieur à ce qui était attendu : 37 mg, 100 %).

Formule brute: $C_{14}H_{17}N_3O_3$
$M = 275\ g.mol^{-1}$

E.IV.3.2.b Greffage du composé $CouCONHNH_2$ sur les supports

Une fraction du composé $CouCONHNH_2$ purifié (0,020 g, 0,07 mmol) est dissoute dans 1 mL de DMF complété à 20 mL avec une solution de bicarbonate de sodium à pH 8,5. Les plaques terminées par une fonction de type –COONHS sont immergées 4 h dans cette solution, à température ambiante et sous agitation magnétique. Elles sont ensuite rincées par immersion dans différents solvants (3 h dans H_2O, 2 h dans EtOH, 1 h dans CH_2Cl_2) sous agitation magnétique, puis séchées.

E.V. Conclusion

Nous avons fonctionnalisé les supports silanisés en vue de réaliser le greffage covalent et orienté d'anticorps. Nous avons synthétisé à même la surface des lames S, un bras espaceur de type polyoxyéthylène terminé par une fonction aminooxy ou hydrazide, lesquelles devraient permettre le greffage d'anticorps par les carbohydrates présents sur leur fragment Fc (après oxydation des diols vicinaux), via une liaison covalente stable de type oxime ou hydrazone respectivement. Plus généralement, ce type de fonctions permet le greffage covalent de composés possédant une fonction aldéhyde.

Nous avons tenu à vérifier qu'au cours de la synthèse du bras espaceur les différentes fonctions avaient bien été introduites sur les supports. Nous avons alors fait réagir le composé CouCHO sur les fonctions intermédiaires de type amine, et le dérivé $CouCONHNH_2$ sur les esters de succinimidyle, et nous avons pu détecter du greffage. Nous avons par ailleurs observé un déplacement vers les grandes longueurs d'onde de la fluorescence de CouCHO greffé sur les supports, à mesure qu'on éloigne le traceur de la surface, c'est-à-dire lorsqu'on intercale un bras espaceur de type polyoxyéthylène.

Nous avons pu également vérifier que les fonctions aminooxy et hydrazide avaient bien été introduites en bout de chaîne et qu'il était possible d'y greffer un composé présentant dans sa structure une fonction aldéhyde (rotor fluorescent CouCHO). Bien que ces résultats demandent à être confirmés par d'autres essais, il semble que le recouvrement surfacique obtenu soit meilleur lorsque le bras espaceur est terminé par une fonction hydrazide.

Les travaux actuellement en cours concernent le greffage covalent d'anticorps commerciaux sur ces supports. Il semble d'après les premiers essais qui ont été réalisés, que dans le cas d'un greffage covalent et orienté, on obtienne de meilleurs résultats en terme de densité de greffage, avec les supports fonctionnalisés par le bras espaceur terminé par une fonction hydrazide. Ces premiers essais demandent à être confirmés et approfondis, ce qui fera l'objet d'une nouvelle étude.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L’objectif de ce travail était de développer un support plan structuré et fonctionnalisé permettant l’immobilisation de biomolécules sondes telles que des anticorps. Le système proposé convient plus généralement à des molécules comportant des fonctions aldéhyde susceptibles de réagir avec les groupements de type amino portés par les supports, pour former une liaison covalente stable.

Nous avons choisi d’immobiliser les sondes sur des supports en verre. Il s’agit de lames commerciales silanisées par l’APTS, lesquelles sont fonctionnalisées par des groupements amino sur les deux faces. Au cours de cette étude, nous avons utilisé des composés plus simples que les anticorps pour valider les différentes étapes entrant dans la préparation des supports fonctionnalisés. Nous avons étudié le greffage covalent de trois rotors fluorescents sur les supports aminés : deux composés acides (un dérivé coumarine et un dérivé cinnamilydène) qui ont été activés sous forme d’esters de succinimidyle et greffés par une liaison amide sur les supports, ainsi qu’un dérivé coumarine aldéhydique, greffé via une liaison imine. Les greffages ont dans un premier temps, été analysés par spectrofluorimétrie. Bien que les lames commerciales présentent une fluorescence intrinsèque non négligeable, nous avons pu détecter la fluorescence de ces trois composés greffés sur les supports, lesquels présentent par ailleurs des caractéristiques spectrales bien distinctes de celles du support.

Nous avons ensuite développé deux méthodes de localisation basées sur la fabrication de motifs polymères réalisés par stéréolithographie. Des puits et des plots en polymère ont été fabriqués sur les supports après étalement d’une résine photosensible hydrophobe : il s’agit de la SU-8 5, laquelle permet de réaliser des motifs très précis d’une épaisseur de l’ordre de 30 à 50 µm. Le principe de ces méthodes consiste à localiser des sites réactionnels amino à l’intérieur de puits en polymère ou à l’emplacement des plots, après protection chimique de toutes les fonctions amine extérieures au polymère. Les profils des motifs polymérisés établis par profilométrie optique, font apparaître des puits et des plots bien résolus. Nous avons toutefois observé un écart entre les dimensions théoriques et réelles des motifs, qui est dû principalement au montage optique de l’appareil de stéréolithographie. Nous sommes parvenus à fabriquer des matrices de puits circulaires mesurant au minimum 2 mm de diamètre. Dans le cas des plots, les plus petits motifs réalisés mesurent 1,35 mm. L'utilisation de la stéréolithographie a pour intérêt qu’elle permet une grande flexibilité au niveau de la conception et de la réalisation du biocapteur.

Pour valider ces méthodes, nous avons utilisé les deux composés fluorescents acides cités précédemment. Les greffages ont été analysés par spectrofluorimétrie et par microscopie à fluorescence. Concernant la méthode de localisation basée sur la fabrication des puits, les greffages covalents sont parfaitement localisés à condition qu'on procède par dépôt, le polymère s'étant révélé être perméable au solvant réactionnel. Nous avons pu greffer les deux fluorophores alternativement dans différents puits sur une même lame et réalisé également sur un même support des essais de greffage au cours du temps. Ceci signifie que les sites isolés à l'intérieur des puits peuvent être assimilés à des mini-réacteurs indépendants.
Quant à la méthode de localisation basée sur la fabrication des plots en polymère, bien qu'il soit possible de réaliser des greffages à leur emplacement, nous ne sommes pas parvenus jusqu'ici, à mettre au point un protocole de protection chimique des sites extérieurs au polymère qui soit reproductible. Ce point doit faire l'objet d'une nouvelle étude.

Pour terminer, nous avons modifié le recouvrement surfacique des lames silanisées pour permettre le greffage covalent de molécules biologiques en s'affranchissant des phénomènes d'adsorption à la surface. Un bras espaceur de type polyoxyéthylène terminé par une fonction aminooxy ou hydrazide a été synthétisé à même les supports aminés, et les différentes étapes entrant dans sa préparation ont pu être validées en procédant au greffage de traceurs fluorescents sur les différentes fonctions intermédiaires et terminales. Ces deux fonctions ont été choisies car elles vont permettre le greffage de molécules porteuses d'une fonction aldéhyde via une liaison covalente stable de type oxime ou hydrazone respectivement.

Les perspectives à l'issue de ce travail concernent l'application biologique, c'est-à-dire le greffage covalent et orienté d'anticorps sur les supports fonctionnalisés avec le bras espaceur terminé par une fonction hydrazide.

ANNEXES

Liste des annexes :

Annexe 1 Description des méthodes spectroscopiques : la spectrophotométrie et la spectrofluorimétrie 213
Annexe 2 Etalonnage du p-nitrobenzaldéhyde en solution dans l'acide acétique dilué 223
Annexe 3 Etalonnage du 3-formyl-7-(N,N-diéthylamino)coumarine(CouCHO) en solution dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.) 225
Annexe 4 Analyses réalisées avec le microscope ZEISS Axiotech : jeux de filtres utilisés. 227
Annexe 5 Etude de la réactivité des sites $-NH_2$ protégés par le polymère : CiNHS greffé par mouillage sur la face anciennement polymérisée ; analyse en fluorescence..... 228
Annexe 6 Greffage de la 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine sur les lames –COONHS : plaque testée avec CouCHO, analysée avec le FluoroLog 3..... 229
Annexe 7 Comparaison entre la fluorescence intrinsèque d'une plaque S vierge et celle d'une plaque S greffée avec le bras espaceur NH_2-POE-NH_2 terminé par une fonction aminooxy 230

Annexe 1 ***Description des méthodes spectroscopiques : la spectrophotométrie et la spectrofluorimétrie***

A. La spectroscopie d'absorption UV-visible

Cette technique est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules d'absorber des longueurs d'ondes caractéristiques du spectre UV-visible.

1) Théorie de la spectroscopie d'absorption UV-visible

En l'absence de toute perturbation extérieure, chaque molécule se trouve généralement dans un état énergétiquement stable appelé état fondamental. L'absorption d'un photon par une molécule peut avoir lieu lorsque celui-ci possède une énergie qui correspond exactement à l'écart entre deux niveaux énergétiques de la molécule ; il y a alors promotion d'un électron depuis une orbitale d'énergie E_1 vers une orbitale inoccupée d'énergie E_2 plus élevée. La molécule se trouve alors dans un état dit excité.
Ce gain d'énergie, qui correspond à l'énergie transportée par un photon, est donné par la relation :

$$\Delta E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

Avec :

- ΔE : écart entre deux niveaux d'énergie de la molécule (= énergie d'un photon à la longueur d'onde λ), en Joules (J)
- h : constante de Planck, $h = 6{,}626.10^{-34}$ J.s
- ν : fréquence de la radiation, en s^{-1}
- c : célérité de la lumière, $c = 3.10^{8}$ $m.s^{-1}$
- λ : longueur d'onde de la lumière incidente, en m

L'excitation de la plupart des molécules s'effectue par absorption de photons dans une gamme de longueurs d'onde s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. La région du visible s'étend de 400 à 800 nm et la région ultraviolette de 150 à 400 nm.

La densité optique (DO) ou absorbance (A) d'une solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Une source lumineuse émet un rayonnement monochromatique d'intensité I_0. L'échantillon à analyser est contenu dans une cuve (en quartz, en verre ou en plastique) placée sur le trajet lumineux ; une cellule réceptrice mesure l'intensité transmise I_t.
Pour les solutions diluées, la loi de Beer-Lambert établit une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration des espèces absorbantes :

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \log \frac{I_0}{I_0 - I_a} = \varepsilon c l$$

Avec :

I_a : intensité absorbée ($I_a = I_0 - I_t$)

ε : coefficient d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

c : concentration de la solution ($mol.L^{-1}$)

l : longueur de la cuve contenant la solution à analyser (cm)

Généralement, on utilise des cuves dont le trajet optique mesure 1 cm ; l'expression de la loi de Beer-Lambert se trouve alors simplifiée :

$$A = \varepsilon \times c$$

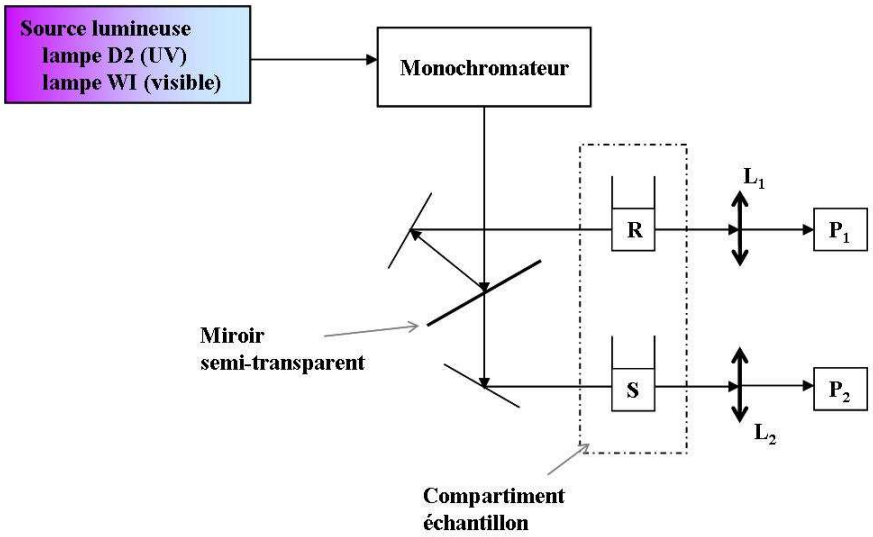
Les cuves doivent être maintenues très propres, particulièrement les faces polies placées sur le trajet lumineux.

Le choix du solvant dans lequel est dissous le produit à analyser est par ailleurs très important. En effet, il doit être transparent dans la région examinée. De plus, les molécules étudiées sont susceptibles d'interagir avec le solvant. Il s'agit généralement de stabilisation par liaisons hydrogène. La longueur d'onde et l'intensité du maximum d'absorption varient selon la nature du solvant, du fait des changements de polarité.

En pratique, on mesure l'absorption relative de la lumière par rapport à une référence.

2) Description du spectrophotomètre ***Lambda EZ210 PerkinElmer***

L'appareil que nous avons utilisé est un spectrophotomètre ***Lambda EZ210 PerkinElmer***. Son principe de fonctionnement est schématisé ci-dessous :



Principe de fonctionnement du spectrophotomètre ***Lambda EZ210 PerkinElmer***

Ce spectrophotomètre est équipé d'une lampe au deutérium (D2) et d'une lampe à iodure de tungstène (WI) qui émettent respectivement dans l'UV et dans le visible. La plage de longueurs d'onde mesurables s'étend de 190 à 1100 nm (commutation automatique des deux lampes à 340 nm) et la résolution spectrale est égale à 2 nm (par défaut).

La lumière émise est dirigée vers un monochromateur qui se compose d'un réseau de diffraction concave et d'un ensemble de fentes mécaniques. Il permet de sélectionner les longueurs d'onde pour lesquelles les mesures vont être réalisées.

Le faisceau monochromatique ainsi créé est dirigé vers un miroir semi-transparent. Le faisceau est alors séparé en deux : une partie du rayonnement va traverser l'échantillon (S), et l'autre, la solution de référence (R). Le système est conçu de telle sorte que les trajets optiques pour l'échantillon et pour la référence soient identiques.

Après avoir traversé les cuves (en quartz, en verre, ou en plastique), les deux faisceaux sont focalisés respectivement par les lentilles L_1 et L_2 sur les détecteurs P_1 et P_2, deux photodiodes au silicium.

Le spectrophotomètre est piloté par un ordinateur (HP Vectra), lequel permet le réglage des paramètres d'excitation, l'acquisition et le traitement des données.

3) Applications de la spectroscopie UV-visible

D’un point de vue qualitatif, les spectres UV fournissent généralement moins de renseignements sur les structures moléculaires que les spectres RMN ou IR. Néanmoins, ils peuvent permettre de rendre compte de modifications apportées dans la structure d’une molécule par comparaison avec son spectre de référence (déplacement des maxima d’absorption), ainsi que des effets de solvant.

D’un point de vue quantitatif, par application de la loi de Beer-Lambert dans le cas de solutions suffisamment diluées, il est possible de doser des espèces en solution, pourvu qu’on soit au-dessus de la limite de détection de l’appareil. Cette technique d’analyse est en effet bien moins sensible que les techniques fluorimétriques (jusqu’à 1 000 fois plus sensibles que la spectrophotométrie !).

Enfin, la connaissance des maxima en absorption UV-visible des composés fluorescents que nous avons utilisés au cours de notre étude, va nous être utile pour tracer leurs spectres d’émission de fluorescence.

B. La spectroscopie de fluorescence

1) Théorie de la spectroscopie de fluorescence

Lorsqu'une molécule, après avoir absorbé un photon, se trouve dans un état excité, elle peut revenir à l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence. Plus précisément, il s'agit d'une transition électronique depuis un état excité singulet noté S_n (n > 0) vers l'état fondamental S_0, singulet lui aussi. Dans l'état fondamental, les deux électrons qui occupent la même orbitale moléculaire ont des spins opposés. Lorsqu'un des deux électrons est promu dans une orbitale d'énergie supérieure, son spin est en principe inchangé et il se trouve dans un état excité dit singulet ; si l'électron promu subit une inversion de son spin, il se trouve alors dans un état dit triplet T_n (n > 0), de plus basse énergie par rapport à S_n.

Le diagramme de Jablonski présenté ci-dessous permet d'illustrer les diverses transitions électroniques consécutives à l'absorption d'un photon :

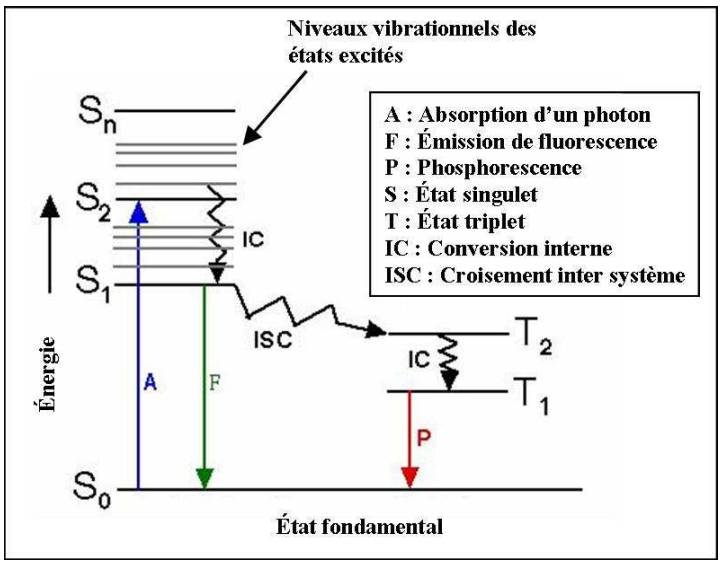


Diagramme de Jablonski

A chaque état énergétique correspondent plusieurs niveaux vibrationnels. A température ambiante, la molécule excitée retombe rapidement (10^{-11}-10^{-9} s) au niveau vibrationnel de plus basse énergie de S_1 : ce processus non radiatif est appelé conversion interne (IC).

Plusieurs voies de désexcitation sont alors possibles :

• **La molécule revient à l'état fondamental S_0 en émettant un photon de fluorescence (10^{-15} s).** La durée de vie de l'état excité singulet est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-7} s. Pendant ce temps, la molécule subit néanmoins des changements conformationnels et elle est sujette à de multiples interactions avec son environnement. L'énergie de S_1 est donc partiellement dissipée, soit sous forme de chaleur, soit par transferts d'énergie avec les molécules du milieu. Le photon de fluorescence qui est réémis possède donc une énergie $h\nu_{ém}$ inférieure à l'énergie du photon absorbé $h\nu_{ex}$, et comme $\nu = c/\lambda$ l'émission de fluorescence se fera à une longueur d'onde $\lambda_{ém}$ plus grande que la longueur d'onde d'excitation λ_{ex}. La différence entre ces deux valeurs ($\lambda_{ém}$-λ_{ex}) est appelée déplacement de Stokes. Si celui-ci est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres.

On définit une grandeur qui est le rendement quantique de fluorescence Φ_F : il correspond au rapport du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés :

$$\Phi_F = \frac{nombre\ de\ photons\ émis\ par\ fluorescence}{nombre\ de\ photons\ absorbés}$$

Parmi les divers paramètres exerçant une influence sur l'émission de fluorescence d'une molécule, on peut citer :

- La température : lorsqu'elle augmente, la part des divers processus de désexcitation en compétition avec l'émission de fluorescence augmente. Il s'ensuit une diminution du rendement quantique de fluorescence.
- La polarité du solvant : lorsque la polarité augmente, l'état excité étant plus stable, on observe un déplacement de l'émission de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde.
- Le pH (transferts de protons).
- La présence d'autres molécules dans le même milieu, qui peut se traduire par une inhibition de fluorescence (désactivation par collisions, transferts d'électrons, etc.).
- La concentration (effets de filtre interne à fortes concentrations).
- etc.

- **La molécule passe à l'état triplet T_1 par une transition non radiative appelée croisement inter système (ISC).** Elle peut alors retourner à l'état fondamental en émettant un photon de phosphorescence (P) à une longueur d'onde supérieure à la longueur d'émission de fluorescence, puisque l'état triplet T_1 est moins énergétique que l'état singulet S_1. Cependant, la probabilité qu'un électron passe de S_1 à T_1 (10^{-10}-10^{-8} s) est nettement plus faible que la désexcitation radiative de S_1 vers S_0 (10^{-15} s). Par ailleurs, la durée de vie d'un état triplet par rapport à un état singulet est plus grande (10^{-6} à 1 s !) : la probabilité que la molécule se désactive depuis cet état par divers processus non radiatifs est donc plus importante. C'est pourquoi il est plus rare d'observer le phénomène de phosphorescence.

- **La molécule retourne à l'état fondamental sans émettre de photons (réactions chimiques, transferts d'énergie, transferts d'électrons, etc.).** Ces transitions non radiatives sont plus ou moins probables et dépendent de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule.

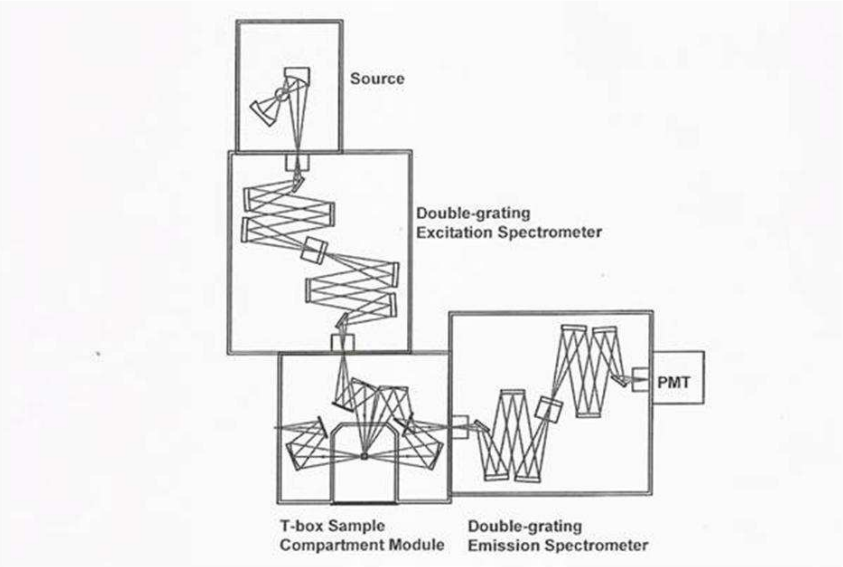
Ainsi un spectre d'émission de fluorescence traduit la distribution des probabilités des transitions électroniques à partir du plus bas niveau vibrationnel de S_1 (et parfois de S_2) vers les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0.

A l'inverse, un spectre d'excitation de fluorescence traduit la distribution des probabilités des transitions électroniques depuis l'état fondamental vers les divers niveaux vibrationnels excités. Lorsque les variations d'intensité de la lumière incidente avec la longueur d'onde sont compensées, le spectre d'excitation est identique au spectre d'absorption [Valeur, 2004].

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence sont globalement symétriques par rapport à une transition (effet miroir).

2) Description du spectrofluorimètre Spex FluoroLog-3 (HORIBA Jobin Yvon)

L'appareil que nous avons utilisé est un ***Spex FluoroLog-3*** de chez ***HORIBA Jobin Yvon***. Son principe de fonctionnement est illustré sur le schéma présenté ci-dessous :



Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre
Spex FluoroLog-3 HORIBA Jobin Yvon

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- La lampe Xénon délivre une puissance de 450 W. Elle émet dans l'UV-visible entre 240 et 850 nm.
- Les monochromateurs d'excitation et d'émission se composent d'un ensemble (réseau diffracteur + fentes mécaniques). Plus les fentes sont étroites, meilleure est la résolution spectrale, mais ceci au détriment du rapport signal/bruit. Il s'agit de trouver le meilleur compromis en fonction de l'échantillon analysé.
- La photodiode joue le rôle de détecteur de référence. La lumière qui sort du monochromateur d'excitation arrive sur un miroir semi-transparent : la majorité est réfléchie et vient irradier l'échantillon, tandis qu'une petite fraction est récupérée par la photodiode. En normalisant le signal reçu par le photomultiplicateur par celui reçu par la photodiode, on s'affranchit des éventuelles variations d'intensité de la lampe au cours du temps.

- Le détecteur est un photomultiplicateur : il transforme un signal lumineux en un signal électrique qui est amplifié (effet photoélectrique). Il fonctionne en mode "comptage de photons".
- Le compartiment échantillon peut comporter un porte-cuve ou un porte-plaque interchangeables.
- Le FluoroLog-3 est entièrement contrôlé par le logiciel ***DataMax*** (Jobin Yvon).

3) Intérêt des techniques fluorimétriques – applications de la fluorescence

L'intérêt particulier porté aux techniques fluorimétriques, tient au fait qu'elles sont à la fois très sensibles et hautement spécifiques. En effet, une espèce fluorescence est caractérisée, dans un environnement donné, par ses spectres d'excitation et d'émission (maxima et allures des courbes), son rendement quantique de fluorescence, sa durée de vie de fluorescence (durée de vie statistique de l'état excité S_1). Pour une molécule donnée, la modification de ces caractéristiques informe sur les changements survenus dans le milieu d'analyse (changements de polarité, de température, interactions avec d'autres molécules, etc.), voire au niveau de la structure même de la molécule.

Contrairement à la spectrophotométrie, la détection ne se fait pas par rapport à une référence, mais le photomultiplicateur (PM) opère un comptage de tous les photons émis, d'où une plus grande sensibilité de la technique. La limite de détection dans un spectrofluorimètre atteint 10^{-9} à 10^{-12} mol/L, et peut descendre jusqu'à 10^{-17} mol/L en microscopie à fluorescence !
Cependant, du fait qu'on travaille sans référence, la possibilité d'observer des artéfacts est plus grande : en effet, le photomultiplicateur prend en compte tous les photons émis, notamment ceux pouvant provenir d'impuretés présentes dans le milieu d'analyse ou sur les parois de la cuve, ainsi que le signal correspondant à la diffusion par l'échantillon de la lumière excitatrice.

Par ailleurs, pour des solutions suffisamment diluées, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. L'écart par rapport à la linéarité augmente avec la concentration et il est possible d'observer pour de fortes concentrations une diminution de l'intensité de fluorescence due à des effets de filtres internes.

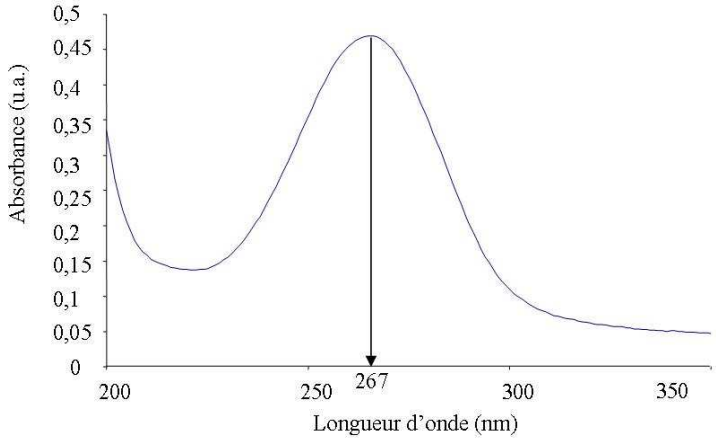
Les principales applications de la fluorescence sont :

- La détection et le dosage d'espèces fluorescentes.
- La détection et le dosage d'espèces à l'aide de sondes fluorescentes (puces à ADN, balises moléculaires, dosage de protéines, d'anticorps, etc.).
- La mesure des distances entre espèces dans les cas de transferts de fluorescence.
- L'étude de l'influence des paramètres du milieu sur la fluorescence moléculaire.
- L'étude des modifications structurales ou chimiques d'une molécule fluorescente.
- Et de nombreuses applications pratiques (lampes fluorescentes, marquage de sécurité de documents, criminologie, décoration, spectacle, etc.).

Annexe 2 *Etalonnage du p-nitrobenzaldéhyde en solution dans l'acide acétique dilué*

Dosage des groupements amino surfaciques des plaques S par le p-nitrobenzaldéhyde

Pour pouvoir doser par spectrophotométrie le p-nitrobenzaldéhyde dans l'hydrolysat, nous avons procédé à l'étalonnage de ce composé dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.).
Les spectres d'absorption ont été réalisés entre 200 nm et 350 nm.



Spectre d'absorption du p-nitrobenzaldéhyde (10^{-5} mol/L)
en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.)

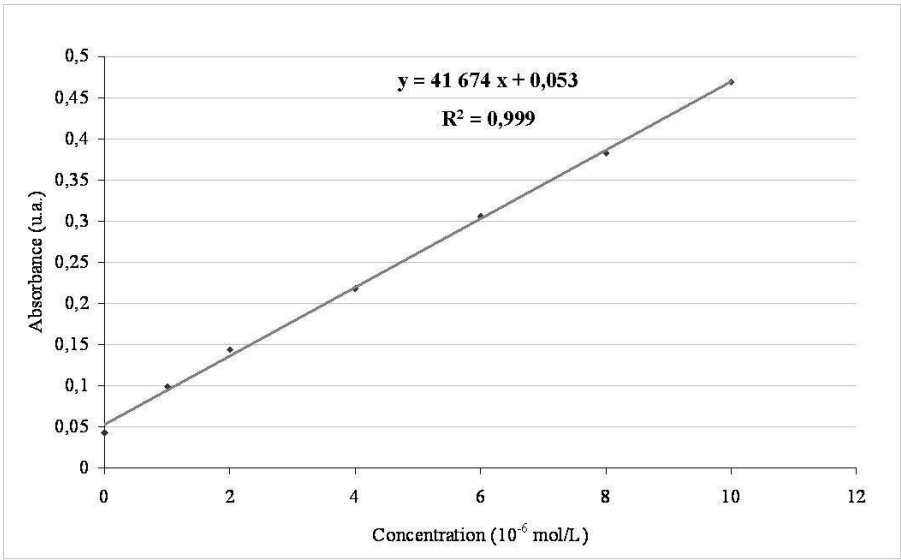
Le maximum d'absorption se situe à 267 nm.

Les solutions étalon ont été préparées par dilutions en cascade dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.). Les valeurs des concentrations de ces solutions ainsi que l'absorbance à 267 nm sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Concentration ($mol.L^{-1}$)	0	1.10^{-6}	2.10^{-6}	4.10^{-6}	6.10^{-6}	8.10^{-6}	1.10^{-5}
Absorbance à 267 nm (u.a.)	0,043	0,099	0,144	0,218	0,306	0,383	0,469

Etalonnage du p-nitrobenzaldéhyde en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.)

La limite de détection de l'appareil se situe dans ce cas vers 5.10^{-7} $mol.L^{-1}$.Le tracé de l'absorbance en fonction de la concentration est représenté ci-après :



Droite d'étalonnage du p-nitrobenzaldéhyde en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.)
Absorbance (267 nm) vs Concentration

Annexe 3 *Etalonnage du 3-formyl-7-(N,N-diéthylamino)coumarine(CouCHO) en solution dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.)*

Dosage des groupements amino surfaciques des plaques S par CouCHO

L'étalonnage du traceur fluorescent CouCHO dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.) a été réalisé avec le FluoroLog 3.
Les maxima à l'excitation et à l'émission se situent respectivement à 453 nm et 500 nm.

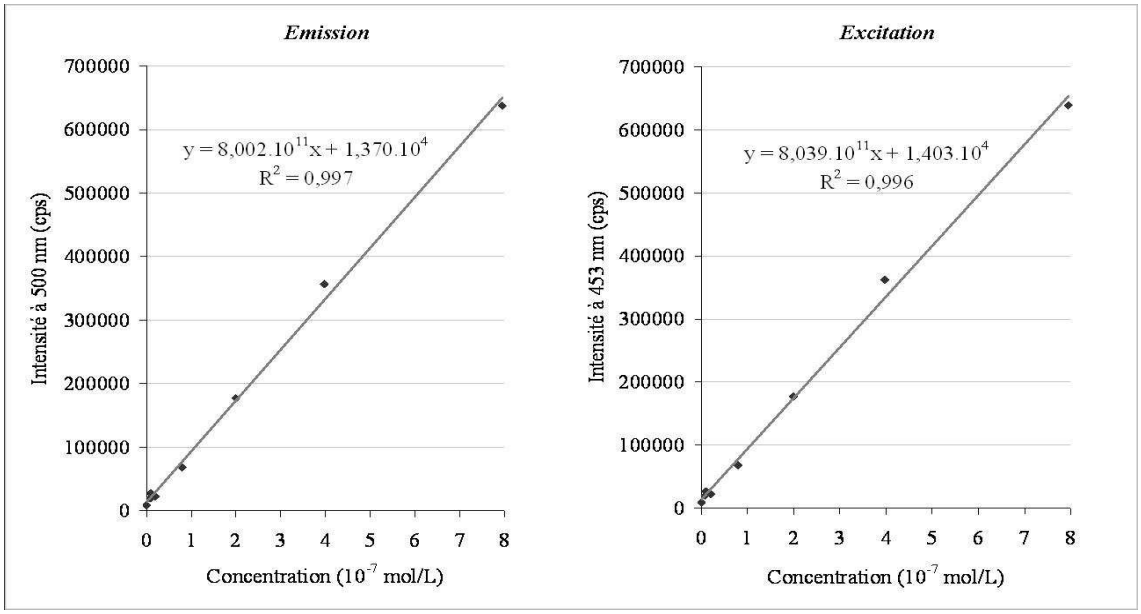
Les solutions étalon ont été préparées par dilutions en cascade en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.) à partir de la solution mère (S_0). Cette dernière a été préparée dans l'éthanol absolu, CouCHO étant plus soluble dans ce solvant que dans l'eau. Les mesures ont été réalisées avec une résolution spectrale égale à 3 nm.
Les valeurs des concentrations de ces solutions ainsi que leurs maxima en émission (à 500 nm) et en excitation (à 453 nm) sont reportés dans le tableau présenté ci-dessous :

Concentration ($mol.L^{-1}$)	Spectres d'émission Intensité à 500 nm (cps)	Spectres d'excitation Intensité à 453 nm (cps)
S_0 à $7,96.10^{-4}$	-	-
$7,95.10^{-7}$	637 264	638 951
$3,97.10^{-7}$	356 611	362 306
$1,99.10^{-7}$	177 191	177 217
$7,95.10^{-8}$	68 047	67 863
$1,99.10^{-8}$	*22 023*	*22 331*
$9,95.10^{-9}$	*27 320*	*26 816*
$7,95.10^{-9}$	*19 519*	*19 936*
0	8 608	9 357

Etalonnage de CouCHO en milieu acide acétique dilué (0,16 % vol.)

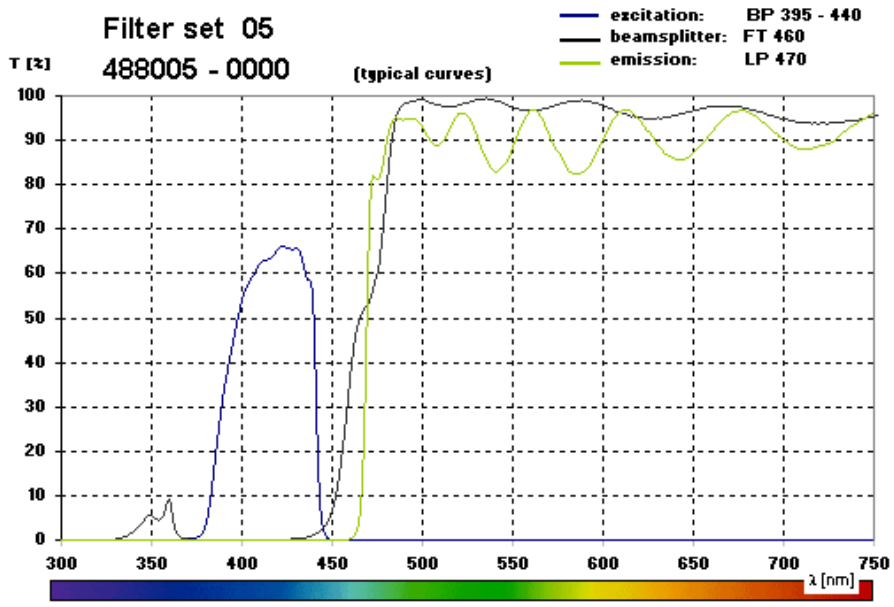
Remarque : Pour les concentrations inférieures à 2.10^{-8} $mol.L^{-1}$, on observe des fluctuations statistiques car le rapport signal/bruit devient très faible. Le seuil de détection de l'appareil pour CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué se situe donc vers 2.10^{-8} $mol.L^{-1}$.

Au dessus de 2.10^{-8} mol.L^{-1}, les intensités au maximum d'excitation (à 453 nm) et d'émission (à 500 nm) varient linéairement avec la concentration :

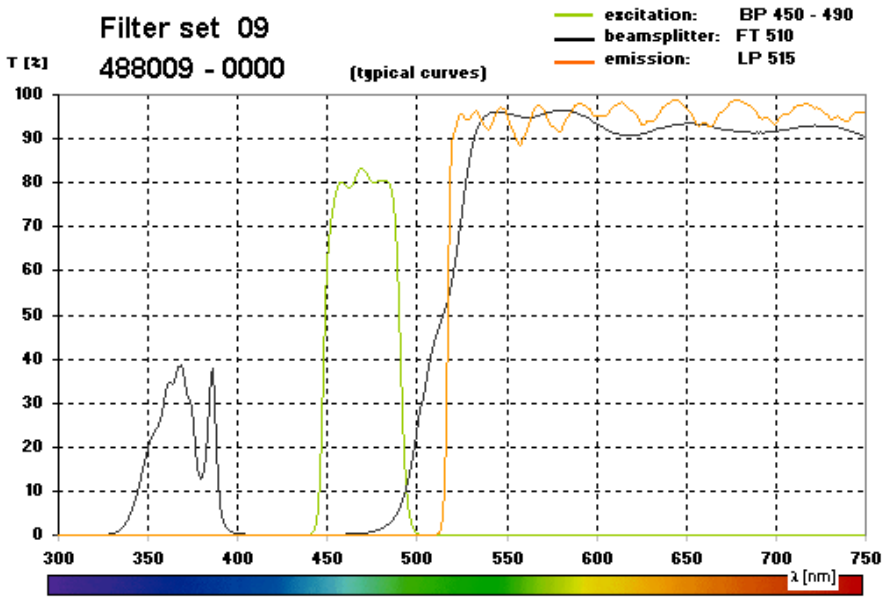


Etalonnage de CouCHO en solution dans l'acide acétique dilué (0,16 % vol.)
Emission : Intensité (500 nm) vs Concentration ; Excitation : Intensité (453 nm) vs Concentration

<u>Annexe 4</u> ***Analyses réalisées avec le microscope ZEISS Axiotech : jeux de filtres utilisés***



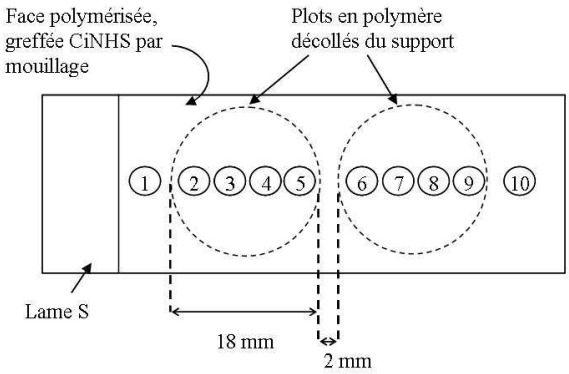
Jeu de filtres 5,cou (N°05, Zeiss) pour l'analyse du composé CouNHS



Jeu de filtres 9,*Ci* (N°09, Zeiss) pour l'analyse du composé CiNHS

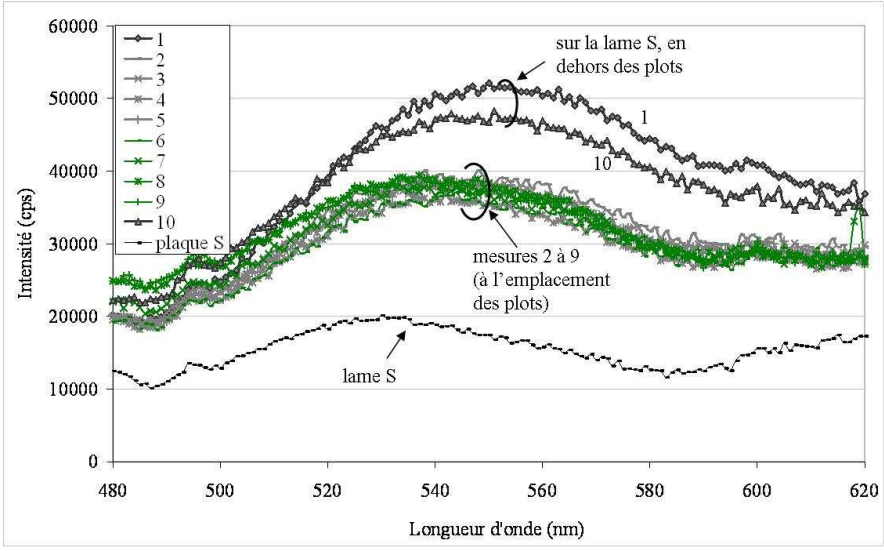
Annexe 5 *Etude de la réactivité des sites –NH_2 protégés par le polymère : CiNHS greffé par mouillage sur la face anciennement polymérisée ; analyse en fluorescence*

Deux plots mesurant 18 mm de diamètre (d_{th}) et distants bords à bords de 2 mm ont été polymérisés sur une lame S, puis décollés du support par immersion dans du DMF. Le cinnamilydène est ensuite greffé sur toute la surface sur laquelle ont été réalisées les polymérisations, en procédant par mouillage.
La fluorescence a été mesurée en 4 points à l'intérieur de chaque plot (10 mesures au total).



CiNHS greffé par mouillage à l'emplacement des plots en polymère
Analyse au spectrofluorimètre

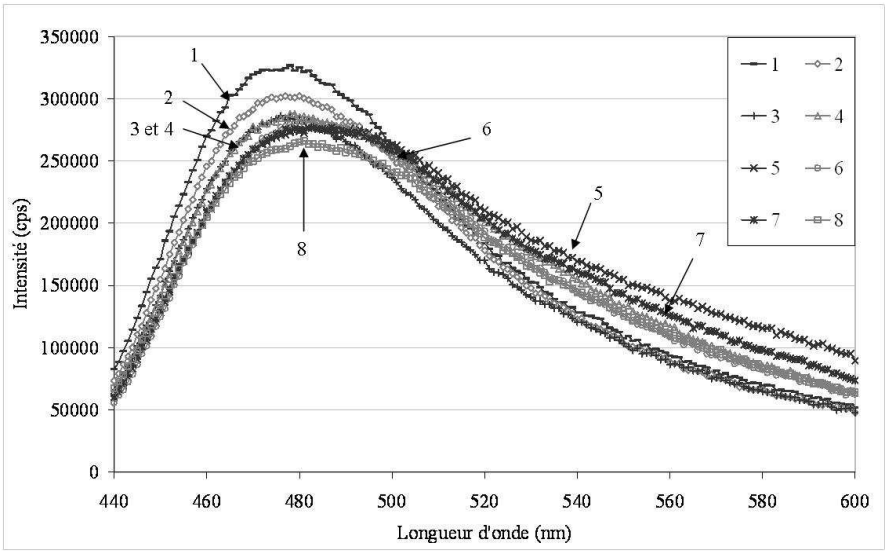
Le spectre de fluorescence d'une plaque S vierge, mesuré dans les mêmes conditions, est également reporté sur la figure ci-dessous :



CiNHS greffé sur la surface polymérisée : spectres d'émission de fluorescence
(λ_{exc} = 470 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Annexe 6 *Greffage de la 4,7,10-trioxa-1,13-tridécanediamine sur les lames –COONHS : plaque testée avec CouCHO, analysée avec le FluoroLog 3*

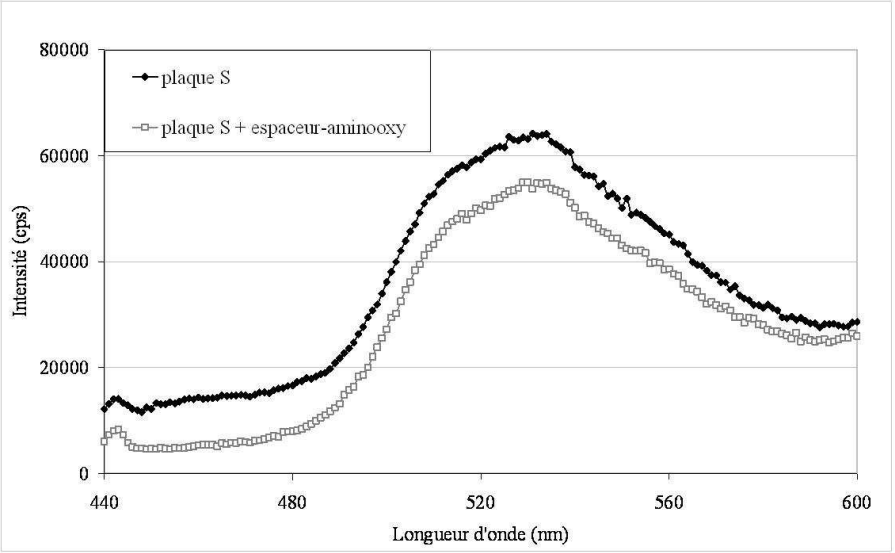
Le rotor fluorescent CouCHO a été greffé sur une plaque –NH-POE-NH_2 (plaque S greffée avec le bras espaceur diamino). La fluorescence a été analysée en 8 points le long de la lame. Les courbes présentées ci-après ont été obtenues après déduction du signal de la plaque.



Plaque –NH-POE-NH2 testée avec CouCHO - spectres d'émission de fluorescence (λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

Annexe 7 ***Comparaison entre la fluorescence intrinsèque d'une plaque S vierge et celle d'une plaque S greffée avec le bras espaceur NH_2-POE-NH_2 terminé par une fonction aminooxy***

La fluorescence d'une lame S vierge et d'une lame S greffée avec le bras espaceur NH_2-POE-NH_2 terminé par une fonction aminooxy a été mesurée pour une excitation à 423 nm :



Spectres d'émission de fluorescence d'une plaque S vierge
et d'une plaque S greffée avec le bras espaceur terminé par une fonction aminooxy
(λ_{exc} = 423 nm, mode Sc/Rc, f = 3 nm)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adibnejad, M.
Rotors moléculaires fluorescents. Synthèse – Etude photophysique – Applications
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy, 1996

Afanassiev V., Hanemann V., Wölfl S.
Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film
Nucleic Acids Res. 28 (**2000**) 1-5

Affymetrix
www.affymetrix.com

Akerstrom B., Björk L.
A physiochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties
J. Biol. Chem. 251 (**1986)** 261-265

Akkoyun A., Bilitewski U.
Optimisation of glass surfaces for optical immunosensors
Biosens. Bioelectron. 17 (**2002**) 655-664

André J.C., Corbel S.
Stéréophotolithographie laser
Paris : Polytechnica Ed., 1994

André J.C., Le Mehaute A., De Witte O.
Dispositif pour réaliser un modèle de pièce industrielle
Brevet Français No. 8411241 (**1984**)

Angenendt P., Glökler J., Murphy D., Lehrach H., Cahill D.J.
Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials
Anal. Biochem. 309 (**2002**) 253-260

Angenendt P., Glökler J., Sobek J., Lehrach H., Cahill D.J.
Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications
J. Chromatogr. A 1009 (**2003**) 97-104

Arenkov P., Kukhtin A., Gemmel A., Voloshchuk S., Chupeeva V., Mirzabekov A.
Protein microchips : use for immunoassay and enzymatic reactions
Anal. Biochem. 278 (**2000**) 123-131

Avseenko N.V., Morozova T.Y., Ataullakhanov F.I., Morozov V.N.
Immunoassay with multicomponent protein microarrays fabricated by electrospray deposition
Anal. Chem. 74 (**2002**) 927-933

Bader R., Hinz M., Schu B., Seliger H.
Oligonucleotide microsystème of a 200-mer and of one-dimensional arrays on a surface hydroxylated polypropylene tape
Nucleosides Nucleotides 16 (**1997**) 829-833

Bauer L., Suresh K.S.
S-[ω-(Aminooxy)alkyl]isothiuronium salts, ω,ω'-bis(aminooxy)alkanes and related compounds
J. Org. Chem. 28 (**1963**) *1604-1608*

Beier M., Hoheisel J.D.
Versatile derivatization of solid support media for covalent binding on DNA-microchips
Nucleic Acids Res. 27 (**1999**) 1970-1977

Benjelloun A., Adibnejad M., Brembilla A., Carré M.C., Viriot M.L., Lochon P., Reis E Sousa T.
Detection of hydrophobic microdomains in aqueous solutions of amphiphilic polymers using fluorescent molecular rotors
J. Fluoresc. 7 (**1997**) 187S-190S

Benters R., Niemeyer C.M., Drutschmann D., Blohm D., Wohrle D.
DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems
Nucleic Acids Res. 30 (**2002**) E10

Canne L.E., Bark S.J., Kent S.B.H.
Extending the applicability of native chemical ligation
J. Am. Chem. Soc. 118 (**1996**) 5891-5896

Charles P.T., Goldman E.R., Rangasammy J.G., Schauer C.L., Chen M.-S., Taitt C.R.,
Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications
Biosens. Bioelectron. 20 (**2004**) 753-764

Chen D., Yan Z., Cole D.L., Srivatsa G.S.
Analysis of internal (n-1)mer deletion sequences in synthetic oligodeoxyribonucleotides by hybridization to an immobilized probe array
Nucleic Acids Res. 27 (**1999**) 389-395

Darne, R.
Etude photophysique des transferts pariétaux.- 221p.
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy (1996)

De Wildt R.M., Mundy C.R., Gorick B.D., Tomlinson I.M.
Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions
Nat. Biotechnol. 18 (**2000)** 989-994

Diao J., Ren D., Engstrom J.R., Lee K.H.
A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors
Anal. Biochem. 343 (**2005)** 322-328

Dufaud O., Corbel S.
Stereolithography of PZT ceramic suspensions
Rapid Prototyping Journal 8 (**2002**) 83-90

Dugas V., Broutin J., Souteyrand E.
Droplet evaporation study applied to DNA chip manufacturing
Langmuir 21 **(2005)** 9130-9136

Ekins R., Chu F., Biggart E.
Multispot, multianalyte, immunoassay
Anal. Biol. Clin. 48 (**1990**) 655-666

Ekins R., Chu F.W.
Microarrays : their origins and applications
Trends Biotechnol. 17 (**1999)** 217-218

Engvall E., Perlman P.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry 8 (**1971**) 871-874

Even P., Chaubet F., Letourneur D., Viriot M.L., Carré M.C.
Coumarin-like fluorescent molecular rotors for bioactive polymers probing
Biorheology 1 **(2003**) 62-66

Falsey J.R., Renil M., Park S., Li S., Lam K.S.
Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays
Bioconj. Chem. 12 (**2001)** 346-353

Fodor S., Read J., Pirrung M., Stryer L., Liu A., Solas D.
Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis
Science 251 (**1991**) 767-773

Frank R.
Spot-synthesis : an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support
Tetrahedron 48 (**1992**) 9217-9232

Gelorme J.D., Cox R.J., Guterrez S.A.R.
Photoresist composition and printed circuit boards and packages made therewith
US Patent No. 4882245 (**1989**)

Geoffroy-Chapotot, C.
Elaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique et imagerie par microscopie optique en champ proche
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy (1998)

Geoffroy-Chapotot C., Carré M.C., Baros F., Muller S., Dumas D., Stoltz J.F., Viriot M.L.
Three-dimensional fluorescence microscopy of endothelial cells labeled with coumarins
J. Fluoresc. 10 (**2000**) 203-207

Gering J.P., Quaroni L., Chumanov G.
Immobilization of antibodies on glass surfaces through sugar residues
J. Colloid Interface Sci. 252 **(2002)** 50-56

Gibson F.S., Bergmeier S.C., Rapoport H.
Selective removal of an N-BOC protecting group in the presence of a tert-butyl ester and other acid-sensitive groups
J. Org. Chem. 59 **(1994)** 3216-3218

Goudswaard J., Van der Donk J.A., Noordzu A., Van Dam R.H., Vaerman J.-P.
Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins
Scand. J. Immunol. 8 (**1978)** 21-28

Grandjean C., Santraine V., Fruchart J.-S., Melnyk O., Gras-Masse H.
Combined thioether/hydrazone chemoselective ligation reactions for the synthesis of glycocluster-antigen peptide conjugates
Bioconjugate Chem. 13 (**2002)** 887-892

Guerin L.J.
"The *SU8* homepage"
www.geocities.com/guerinlj/

Guerin L.J., Bossel M., Demierre M., Calmes S., Renaud P.
Proceedings of the International Solid State Sensors and Actuators Conference (1997, Chicago)
Transducers '97 2 (**1997)** 1419-1422

Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O.
Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions
Genome Biol. 2 (**2001**) 1-13

Hinczewski C., Corbel S., Chartier T.
Ceramic suspensions suitable for stereolithography
J. Eur. Ceram. Soc. 18 (**1998**) 583-90

Hoffman W.L., O'Shannessy D.J.
Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports
J. Immunol. Methods 112 (**1988**) 113-120

Houseman B.T., Huh J.H., Kron S.J., Mrksich M.
Peptide chips fort he quantitative evaluation of protein kinase activity
Nat. Biotechnol. 20 **(2002)** 270-274

Hull C.W.
Apparatus for production of three dimensional objects by stereolithography
US Patent No. 4575330 (**1984**)

Hyun J., Chilkoti A.
Micropatterning biological molecules on a polymer surface using elastomeric microwells
J. Am. Chem. Soc. 123 (**2001)** 6943-6944

Kaneko T., Willner D., Monkovic I., Knipe J.O., Braslawsky G.R., Greenfield R.S., Vyas D.M.
New hydrazone derivatives of adriamycin and their immunoconjugates – a correlation between acid stability and cytotoxicity
Bioconjugate Chem. 2 (**1991)** 133-141

Ko I.K., Kato K., Iwata H.
Parallel analysis of multiple surface markers expressed on rat neural stem cells using antibody microarrays
Biomaterials 26 (**2005**) 4882-4891

Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P.
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens
Nat. Med. 4 (**1998**) 844-847

Kremsky J.N., Wooters J.L., Dougherty J.P., Meyers R.E., Collins M., Brown E.L.
Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an aldehyde or carboxylic acid group at the 5' terminus
Nucleic Acids Res. 15 (**1987**) 2891-2909

Kumar P., Gupta K.C.
A rapid method fort he construction of oligonucleotide arrays
Bioconjugate Chem. 14 (**2003**) 507-512

Kwon Y., Han Z., Karatan E., Mrksich M., Kay B.K.
Antibody arrays prepared by cutinase-mediated immobilization on self-assembled monolayers
Anal. Chem. 76 **(2004)** 5713-5720

Lahiri J., Ostuni E., Whitesides G.M.
Patterning ligands on reactive SAMs by microcontact printing
Langmuir 15 **(1999)** 2055-2060

Lam K.S., Zhao Z.-G.
Targeted therapy for lymphoma with peptides
Hematology/Oncology Clinic of North America 11 (**1997**) 1007-1019

Lamture J.B., Beattie K.L., Burke B.E., Eggers M.D., Ehrlich D.J., Fowler R., Hollis M.A., Kosicki B.B., Reich R.K., Smith S.R.
Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device
Nucleic Acids Res. 22 (**1994**) 2121-2125

Lee K.-B., Lim J.-H., Mirkin C.A.
Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography
J. Am. Chem. Soc. 125 **(2003)** 5588-5589

Lee M.R., Shin I.
Facile preparation of carbohydrate microarrays by site-specific, covalent immobilization of unmodified carbohydrates on hydrazides-coated glass slides
Org. Lett. 7 (**2005[a]**) 4269-4272

Lee M.-R., Shin I.
Fabrication of chemical microarrays by efficient immobilization of hydrazide-linked substances on epoxide-coated surfaces
Angew. Chem. Int. Ed. 44 (**2005[b])** 2881-2884

Lemaitre M., Dayard B., Lebleu B.
Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84 (**1987**) 648-652

Le Proust E., Pellois J.-P., Yu P., Zhang H., Gao X.
Digital light-directed synthesis. A microarray platform that permits rapid reaction optimization on a combinatorial basis
J. Comb. Chem. 2 **(2000)** 349-354

Levit-Binnun N., Lindner A.B., Zik O., Eshhar Z., Moses E.
Quantitative detection of protein arrays
Anal. Chem. 75 **(2003)** 1436-1441

Lin L.S., Lanza T. Jr., De Laszlo S.E., Truong Q., Kamenecka T., Hagmann W.K.
Deprotection of N-tert-butoxycarbonyl (Boc) groups in the presence of tert-butyl esters
Tetrahedron Lett. 41 (**2000)** 7013-7016

MacBeath G., Koehler A.N., Schreiber S.L.
Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interaction en Masse
Am. Chem. Soc. 121 (**1999**) 7967-7968

Mahieuxe, B.
Capteurs à fibre optique pour le dosage des nitrates.- 241p.
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy *(*1995*)*

Melnyk O., Duburcq X., Olivier C., Urbès F., Auriault C., Gras-Masse H.
Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays
Bioconjugate Chem. 13 (**2002)** 713-720

MicroChem Corporation: Fiches techniques

Monneret S., Provin C., Le Gall H., Corbel S.
Microfabrication of freedom and articulated alumina-based components
Microsystem Technologies 8 (**2002**) 368-374

Moon J.H., Shin J.W., Kim S.Y., Park J.W.
Formation of aminosilane thin layers ; an imine formation to measure relative surface density of the amine group
Langmuir 12 (**1996**) 4621-4624

Muller, C.
Synthèse de groupes photolabiles fluorescents avec comme cible le greffage sur support solide pour des applications en bioscience.- 202p.
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy (2001)

Muller C., Even P., Viriot M.L., Carré M.C.
Protection and labelling of thymidine by a fluorescent photolabile group
Helv. Chim. Acta 84 **(2001**) 3735-3741

Nisnevitch M., Kolog-Gulco M., Trombka D., Green B.S., Firer M.A.
Immobilization of antibodies onto glass wool
J. Chromatogr. B 738 (**2000**) 217-223

Osby J.O., Martin M.G., Ganem B.
An exceptionally mild deprotection of phthalimides
Tetrahedron Lett. 25 (**1984)** 2093-2096

O'Shannessy D.J.
Hydrazido-derivatized supports in affinity chromatography
J. Chromatogr. 510 (1990) 13-21

O'Shannessy D.J., Hoffman W.L.
Site-directed immobilization of glycoproteins on hydrazide-containing solid supports
Biotechnol. Appl. Biochem. 9 (**1987**) 488–496

Park S., Lee M.-R., Pyo S.-J., Shin I.
Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions
J. Am. Chem. Soc. 126 **(2004)** 4812-4819

Park S., Shin I.
Fabrication of carbohydrate chips for studying protein-carbohydrate interactions
Angew. Chem. Int. Ed. 41 **(2002)** 3180-3182

Pavlickova P., Jensen N.M., Paul H., Schaeferling M., Giammasi C., Kruschina M., Du W.-D., Theisen M., Ibba M., Ortigano F., Kambhampati D.
Antibody detection in human serum using a versatile protein chip platform constructed by applying nanoscale self-assembled architectures on gold
J. Proteome Res. 1 (**2002)** 227-231

Peluso P., Wilson D.S., Do D., Tran H., Venkatasubbaiah M., Quincy D., Heidecker B., Pointdexter K., Tolani N., Phelan M., Witte K., Jung L.S., Wagner P., Nock S.
Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays
Anal. Biochem. 312 (**2003**) 113-124

Perlee L.T., Christiansen J., Dondero R., Grimwade B., Lejnine S., Mullenix M., Shao W., Sorette M., Tchernev V.T., Patel D.D., Kingsmore S.F.
Development and standardization of multiplexed antibody microarrays for use in quantitative proteomics
Proteome Science 2 (**2004**) 22 pages

Piehler J., Brecht A., Valiokas R., Liedberg B., Gauglitz G.
A high density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces
Biosens. Bioelectron. 15 (**2000**) 473-481

PIERCE
www.piercenet.com

Podyminogin M.A., Lukhtanov E.A., Reed M.W.
Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass
Nucleic Acids Research 29 (**2001)** 5090-5098

Polzius R., Schneider T., Biert F.F., Bilitewski U.
Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxide waveguides
Biosens. Bioelectron. 11 (**1996)** 503-514

Pope M.R., Armes S.P., Tarcha P.J.
Specific activity of polypyrrole nanoparticulate immunoreagents: comparison of surface chemistry and immobilization options
Bioconjugate Chem. 7 **(1996)** 436-444

Prisyazhony V.S., Fusek M., Alakhov Y.B.
Synthesis of high-capacity immunoaffinity sorbents with oriented immobilized immunoglobulins or their Fab' fragments for isolation of proteins
J. Chromatogr. 424 (**1988**) 243-253

Rasmussen S.R., Larsen M.R., Rasmussen S.
Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells : the molecules are only bound at the 5'-end
Anal. Biochem. 198 (**1991**) 138-142

Reineke U., Volkmer-Engert R., Schneider-Mergener J.
Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology
Curr. Opin. Biotechnol. 12 (**2001**) 59-64

Rubina A.Y., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D.
Hydrogel-based protein microchips : manufacturing, propert and applications
Biotechniques 34 (**2003**) 1008-1014

Ruhn P.F., Garver S., Hage D.S.
Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography
J. Chromatogr. A 669 (**1994**) 9-19

Schneider B.H., Dickinson E.L., Vach M.D., Hoijer J.V., Howard L.V.
Optical chip immunoassay for hCG in human whole blood
Biosens. Bioelectr. 15 (**2000**) 597-604

Shaw J. M., Gelorme J. D., LaBianca N.C., Conley W.E., Holmes S.J.
Negative photoresists for optical lithography
IBM Journal of Research and Development 41 (**1997**) 81-94

Shin D.-S., Lee K.-N., Jang K.-H., Kim J.-K., W.-J. Chung, Kim Y.-K., Lee Y.-S.
Protein patterning by maskless photolithography on hydrophilic polymer-grafted surface
Biosens. Bioelectron. 19 (**2003**) 485-494

Shriver-Lake L.C., Donner B., Edelstein R., Breslin K., Bhatia S.K., Ligler F.S.
Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers
Biosens. Bioelectron. 12 (**1997**) 1101-1106

Singh A.K., Flounders A.W., Volponi J.V., Ashley C.S., Wally K., Schoeniger J.S.
Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I : Immobilization, Characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports
Biosens. Bioelectron. 14 (**1999**) 703-713

Smith E.A., Thomas W.D., Kiessling L.L., Corn R.M.
Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions
J. Am. Chem. Soc. 125 (**2003)** 6140-6148

Song A., Wang X., Lam K.S.
A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with ortho-hydroxyaryl aldehydes or ketones
Tetrahedron Lett. 44 (**2003**) 1755-1758

Taitt C.R., Anderson G.P., Lingerfelt B.M., Feldstein M.J., Ligler F.S.
Nine-analyte detection using and array-based biosensor
Anal. Chem. 74 **(2002)** 6114-6120

Turkova J.
Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function
J. Chromatogr. B 722 (**1999)** 11-31

Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T.A., Judson R.S., Knight J.R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P.
A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae
Nature 403 (**2000**) 623-627

Valeur B.
Invitation à la fluorescence moléculaire, chap. 3
Ed. De Boeck, 2004

Van Gompel J., Schuster G.B.
Chemilluminescence of organic peroxydes: intramolecular electron-exchange luminescence from a secondary perester
J. Org. Chem. 52 **(1987**) 1465-1468

Vankova R., Gaudinova A., Süssenbekova H., Dobrev P., Strnad M., Holik J., Lenfeld J.
Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins
J. Chromatogr. A 811 (**1998**) 77-84

Vijayendran R.A., Leckband D.E.
A quantitative assessment of heterogenéity for surface-immobilized proteins
Anal. Chem. 73 **(2001)** 471-480

Vikholm I., Albers W.M.
Oriented immobilization of antibodies for immunosensing
Langmuir 14 **(1998)** 3865-3872

Volle J.-N., Chambon G., Sayah A., Reymond C., Fasel N., Gijs M.A.M.
Enhanced sensitivity detection of protein immobilization by fluorescent interference on oxidized silicon
Biosens. Bioelectron. 19 (**2003**) 457-464

Wang C.C., Huang R.P., Sommer M., Lisoukov H., Huang R., Lin Y., Miller T., Burke J.
Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines
Journal of Proteome Research 1 (**2002[a])** 337-343

Wang Z.-H., Jin G.
Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry
J. Immunol. Methods 285 (**2004**) 237-243

Wang D.N., Liu S.Y., Trummer B.J., Deng C., Wang A.L.
Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microprobes and host cells
Nat. Biotechnol. 20 (**2002[b])** 275-281

Weiping Q., Bin X., Lei W., Chunxiao W., Danfeng Y., Fang Y., Chunwei Y., Yu W.
Controlled site-directed assembly of antibodies by their oligosaccharide moieties onto APTES derivatized sufaces
J. Colloid Interface Sci. 214 **(1999)** 16-19

Xia Y., Whitesides G.M.
Soft lithography
Angew. Chem. Int. Ed. 37 (**1998)** 550-575

Yeung C., Leckband D.
Molecular level characterization of microenvironmental influences on the properties of immobilized proteins
Langmuir 13 (**1997)** 6746-6754

Yeung C., Purves T., Kloss A.A., Kuhl T.L., Sligar S., Leckband D.
Cytochrome *c* recognition of immobilized, orientational variants of cytochrome b_5: direct force and equilibrium binding measurements
Langmuir 15 (**1999)** 6829-6836

Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette P., Hevesi L., Remacle J.
Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays
Anal. Biochem. 280 (**2000**) 143-150

Zhang J., Tan K.L., Hong G.D., Yang L.J., Gong H.Q.
Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS
J. Micromech. Microeng. 11 (**2001**) 20-26

Zhu H., Snyder M.
Protein chip technology
Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (**2003**) 55-63

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Valery BABAK, Professeur, Russian Academy of Sciences, Russie

Monsieur Philippe GEOFFROY, Chargé de Recherche, Institut de Chimie, Strasbourg

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame Fanny EVENOU

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Irradiations localisées pour des greffages covalents sur supports"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des procédés et des produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 09 octobre 2006
Le Président de l'I.N.P.L.,
L. SCHUFFENECKER

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55