



IMMUNO-TEST SUR CHIMIE CEA-2

FONCTIONNALISATION CEA-2 EN PHASE VAPEUR

Guillaume PAUMIER

*Maître de stage : Guillaume DELAPIERRE
Chef du laboratoire d'accueil : Françoise VINET
Enseignant responsable : Françoise VOILLOT*

CEA / LETI

Département des microTechnologies pour la Biologie et la Santé

Service BioSystem on Chip

Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Micro-systèmes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean Chabbal pour m'avoir accueilli au sein du Département des microTechnologies pour la Biologie et la Santé au CEA-Grenoble ;

Merci également à Françoise Vinet qui m'a accueilli au sein de son laboratoire Fonctionnalisation et Chimie pour les Microsystèmes. Merci de te préoccuper autant du bien-être des membres de ton groupe ;

Merci à Guillaume Delapierre qui a dirigé mon stage en sachant conjuguer conseils avisés et grande autonomie ; le cocktail parfait pour un stage efficace, agréable et formateur !

Merci aux membres du LERI du CEA-Saclay pour leur coopération, tout particulièrement Laure-Marie Neuburger, qui a toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions. Ta présence lors de la présentation des projets m'a fait très plaisir ;

Merci à Alain Troussier pour ses nombreux conseils pratiques sur la salle blanche, la chimie, et les produits ;

Merci à Stéphanie Porte du laboratoire Biopuces pour ses conseils avisés concernant les scanners à fluorescence ;

Merci à Rémi Galland et François Perraut, du laboratoire d'Imagerie des Systèmes d'Acquisition, pour notre travail sur la lecture de fluorescence en continu ;

Merci à Violaine Vizcaino, Stéphane Gétin et Pierre Barritault, du laboratoire d'Ingénierie des Composants Photoniques, pour notre collaboration sur la lecture par effet mirage ;

Merci à Frédérique Mittler pour sa grande disponibilité et le temps qu'elle m'a consacrée sur Biochiplab. Je pense garder encore longtemps le souvenir de cette semaine maudite où aucune manip ne se décidait à fonctionner correctement !

Merci à Cécile Oillic pour notre collaboration sur la silanisation en phase vapeur. Malgré les humeurs changeantes de l'extraction de la salle blanche, ensemble, nous avons fait avancer la science !

Merci à Isabelle, ma chère co-stagiaire, insaïenne (personne n'est parfait), et... poète ;-)

Merci à Véronique pour nos conversations sérieuses (ou pas...), et surtout nos fous rires ;

Merci à Romain et Philippe, mes colocataires du bureau 201, qui étaient aux premières loges pour mes concerts improvisés ;

Enfin, merci à tous les membres des laboratoires FCM et CIV pour leur accueil chaleureux, les discussions du matin en salle café, et les discussions du midi où l'on refait le monde. Merci en particulier à Régis, Fred, Cyril, Marie-Line, Olivier, Nicolas, Florence, Dorothee, Caroline, Jean-Maxime, et Bernard.

Abréviations et Acronymes

Acronymes

CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique
DRT	Direction de la Recherche Technologique
Léti	Laboratoire d'électronique et des technologies de l'information
DTBS	Département des microTechnologies pour la Biologie et la Santé
SBSC	Service BioSystem on Chip
LFCM	Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystems
STD	Service Technologies pour la Détection
LISA	Laboratoire d'Imagerie et des Systèmes d'Acquisition
DOPT	Département d'Optronique
STCO	Service Technologies des Composants Optoélectroniques
LICP	Laboratoire d'Ingénierie des Composants Photoniques
DSV	Direction des Sciences du Vivant
DRM	Département de la Recherche Médicale
SPI	Service de Pharmacologie et d'Immunologie
LERI	Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunoanalyse
DRDC	Département Réponses et Dynamique Cellulaire
LCP	Laboratoire de Chimie des Protéines
ILL	Institut Laue-Langevin

Abréviations spécifiques

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
SP	Substance P
mAb SP31	anticorps monoclonal anti-substance P
FITC	Fluorescéine (fluorophore)
TMR	Tétraméthylrhodamine (fluorophore)
Cy3	Cyanine 3 (fluorophore)
A532	Alexa-532 (fluorophore)
kDa	kiloDalton
RT	<i>Room Temperature</i> , température ambiante ($\sim 20^{\circ}\text{C}$)
PhK	tampon Phosphate de Potassium
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , protéine de blocage de la surface
EIA	<i>Enzyme ImmunoAssay</i> , tampon utilisé lors de tests immunoenzymatiques
US	ultrasons
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , test immunologique courant
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , tampon physiologique
SLD	<i>Scattering Length Density</i>
SMW	<i>Silicon Match Water</i> , eau avec une SLD particulière
CRN	Caractérisation par réflectivité de neutrons
AFM	<i>Atomique Force Microscopy</i> , Microscopie à force atomique
(w/v)	<i>weight / volume</i> , proportion donnée en poids / volume
(v/v)	<i>volume / volume</i> , proportion donnée en volume / volume

Résumé

Au cours de cette étude, nous avons transposé sur support plan un test immunologique utilisé au format capillaire au LERI (CEA-Saclay). Le modèle biologique choisi concerne un neuropeptide, la substance P (SP), et l'anticorps monoclonal anti-SP mAb SP31.

Le greffage de ces molécules a été effectué sur des lames de verre fonctionnalisées avec la chimie de surface CEA-2, développée au CEA - Létiet basée sur le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane. Les protéines et peptides se fixent de façon covalente aux fonctions aldéhyde du silane par leurs terminaisons amine NH_2 . Deux voies possibles ont été testées : greffage des anticorps et reconnaissance par des antigènes marqués (fluorophores), puis greffage des peptides puis reconnaissance par des anticorps marqués. Le greffage des sondes biologiques (anticorps ou antigènes) sur la surface, ainsi que les étapes de reconnaissance avec la cible en solution, ont été optimisés.

Afin de faciliter le transfert de ce procédé dans les microsystèmes, nous avons développé un protocole de silanisation CEA-2 en phase vapeur. Il a été caractérisé par mesure d'angle de contact et microscopie à force atomique. Son optimisation et sa validation sur lames de verre avec notre modèle anticorps – antigène a permis son transfert vers les microsystèmes pour la protéomique. En particulier, nous avons initié une étude sur la silanisation en phase vapeur dans les réacteurs de digestion peptidique développés dans le cadre du projet Biochiplab.

Mots clés : Immuno-test, substance P, anticorps monoclonal, 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane, phase vapeur, digestion peptidique

Keywords : fluorescent immunoassay (FIA), substance P, monoclonal antibody, chemical vapor deposition (CVD), 5,6-epoxyhexyltriethoxysilane, functionalization

Table des matières

Introduction	12
1 Contexte et Objectifs	13
1.1 Les microtechnologies pour la Biologie et la Santé au CEA-Grenoble	13
1.1.1 Activités du CEA-Grenoble	13
1.1.2 Organigramme	14
1.1.3 Le Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes .	14
1.2 Les biopuces à fluorescence au LFCM	15
1.2.1 Fluorescence et fluorophores	15
1.2.2 Compétences, savoir-faire et outils du LFCM	17
1.3 Les biopuces à protéines et à peptides	21
1.3.1 Une exigence de haut débit	21
1.3.2 De multiples applications	21
1.4 Objectifs	22
1.4.1 Développement d'un immuno-test sur chimie CEA-2	22
1.4.2 Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur	22
2 Immuno-test sur chimie CEA-2	23
2.1 Notions de base d'immunologie	23
2.1.1 Anticorps et antigènes	23
2.1.2 La reconnaissance antigène – anticorps	24
2.2 Développement d'un immuno-test sur la Substance P	26
2.2.1 Modèle biologique choisi	26
2.2.2 Protocole-type	28
2.2.3 Paramètres biologiques étudiés	30
2.2.4 Paramètres chimiques étudiés	37
2.2.5 Conclusion : Protocole optimisé	43
2.3 Cinétique de la réaction anticorps – antigène	45
2.3.1 Principe	45
2.3.2 Protocole expérimental	46
2.3.3 Résultats obtenus	46
2.4 Lecture par Effet Mirage	48
2.4.1 Intérêt et principe général	48
2.4.2 Résultats	48
2.5 Caractérisation par Réflectivité de neutrons	50
2.5.1 Principe général	50
2.5.2 Résultats	50

3	Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur	53
3.1	Contexte du projet Biochiplab™	53
3.1.1	Les enjeux de la fonctionnalisation des microsystemes	53
3.1.2	Des microsystemes intégrés dédiés à la protéomique	53
3.1.3	Principe et caractérisation de la digestion peptidique	55
3.2	Protocole de silanisation en phase vapeur	56
3.2.1	Développement d'un protocole	56
3.2.2	Optimisation du protocole	56
3.2.3	Caractérisation des couches de silane par AFM	58
3.2.4	Validation de la silanisation sur lame de verre	58
3.3	Silanisation de microsystemes Biochiplab™	63
3.3.1	Les microsystemes Biochiplab™	63
3.3.2	Caractérisation par fluorescence	63
3.3.3	Résultats de digestion	64
	Conclusion	67
A	Préparation des tampons biologiques	68
A.1	Préparation du tampon phosphate	68
A.2	Préparation du tampon EIA	68
A.3	Préparation des solutions d'immobilisation	68
B	Principe de l'Effet Mirage	69
B.1	Étude Théorique de la Déflexion Photothermique	69
B.1.1	Principe général	69
B.1.2	Différentes configurations	69
B.2	L'Effet Mirage au LICP	70
B.2.1	Instrumentation	70
B.2.2	Détermination de l'absorption d'un échantillon	72
C	Mesure d'angles de contact	73
C.1	Physico-Chimie du mouillage	73
C.2	Notion d'énergie interfaciale	73
C.3	Mouillage total – Mouillage partiel	73
C.4	Angle de contact d'équilibre θ_e	74
C.5	Matériel utilisé	74
D	Microscopie à Force Atomique	75
D.1	Principe	75
D.2	AFM en mode « tapping »	75
	Index	78
	Bibliographie	78

Table des figures

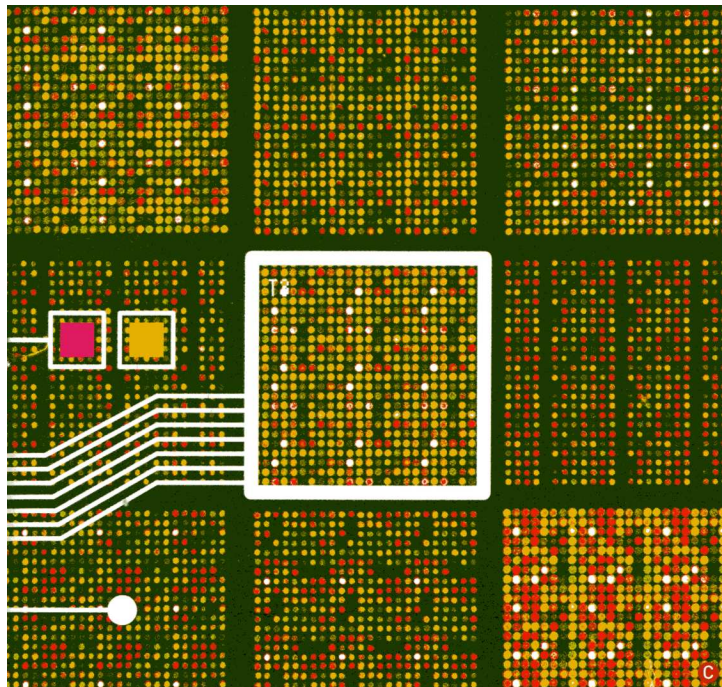
1.1	Extrait de l'organigramme du CEA-Grenoble	14
1.2	Diagramme de JABLONSKI	15
1.3	Loi de STOKES	16
1.4	Scanner à fluorescence GenePix 4000B d'Axon	16
1.5	Palette de fluorescence en niveaux de gris et en fausses couleurs	16
1.6	Structure chimique du 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane	17
1.7	Protocole de la chimie CEA-2	18
1.8	Réacteur de silanisation	19
1.9	Robot Packard BioChip Arrayer	20
2.1	Schéma d'un anticorps	24
2.2	Structure de la substance P	26
2.3	Structure chimique de la biotine	28
2.4	Complexe Streptavidine – Biotine	29
2.5	Étapes de l'immuno-test	31
2.6	Révélation Cy3 de sondes biotinylées avec saturation à la BSA	32
2.7	Révélation Cy3 de sondes biotinylées sans saturation à la BSA	33
2.8	Révélation Cy3 de cibles biotinylées avec saturation à la BSA	34
2.9	Différents pourcentages de glycérol	35
2.10	Incubation pendant 5min	36
2.11	Incubation pendant 1h	37
2.12	Greffage au stade époxyde	38
2.13	Greffage au stade diol	38
2.14	Greffage au stade aldéhyde	38
2.15	Essai de différents réducteurs : sans bain NaBH_4	40
2.16	Essai de différents réducteurs : avec bain NaBH_4	41
2.17	Essai de différents réducteurs : sans bain NaCNBH_3	42
2.18	Essai de différents réducteurs : avec bain NaCNBH_3	42
2.19	Reproductibilité du test biologique	44
2.20	Principe de mesure de la cinétique de réaction anticorps – antigène	45
2.21	Cinétique de liaison anticorps – antigène (500 nM)	46
2.22	Cinétique de liaison anticorps – antigène (1 nM)	47
2.23	Cartographie par effet mirage (100 nM)	49
2.24	Réfectomètre D17 de l'ILL	50
3.1	Transcription de l'ADN en ARN messenger	54
3.2	Traduction de l'ARN messenger en protéines par les ribosomes	54
3.3	Trypsine avec inhibiteur aeruginosine 98-B	55
3.4	Schéma du dépôt en phase vapeur	56
3.5	AFM : Silanisation avec lavage	58

3.6	AFM : Silanisation en phase liquide	59
3.7	Comparaison d'angle de contact phase liquide / phase vapeur	60
3.8	Immuno-test sur chimie CEA-2 vapeur	60
3.9	Immuno-test sur chimie CEA-2 liquide	61
3.10	Homogénéité de la couche de chimie CEA-2 vapeur	62
3.11	Module du digestion Biochiplab avec connecteurs	63
3.12	Silanisation de module de digestion : caractérisation par fluorescence	64
3.13	Digestion Cytochrome C	65
B.1	Schéma de principe de l'Effet Mirage : mode transverse	70
B.2	Schéma de montage du banc de mesure	70
B.3	Schéma d'un détecteur double quadrant	71
B.4	Positionnement relatif pompe / sonde / échantillon	72
C.1	Schéma d'une goutte en mouillage sur une surface solide	74
C.2	Chaîne d'acquisition de la mesure d'angle de contact	74
D.1	Image MEB d'une pointe d'AFM	76
D.2	Schéma simplifié de fonctionnement d'un microscope AFM en mode tapping	76

Liste des tableaux

2.1	Symboles des acides aminés	27
2.2	Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorophores	28
2.3	Schéma de spotting de la série 1	33
2.4	Schéma de spotting de la série 5	36
2.5	Schéma de spotting de la série 4	39
2.6	Schéma de spotting de la série 6	39
2.7	Schéma de spotting de la série 28	40
2.8	Effet Mirage : schéma de spotting manuel	48
2.9	CRN d'une couche de silane CEA-2 sur substrat de silicium	52
2.10	CRN d'une couche d'antigènes	52
2.11	CRN d'une couche d'antigènes avec BSA	52
2.12	CRN d'une couche d'antigènes avec BSA et anticorps spécifique	52
2.13	CRN d'une couche d'antigènes avec BSA et anticorps non spécifique	52
3.1	Angles de contact sur silanisation en phase vapeur	57
3.2	Angles de contact obtenus pour différentes activations	58

Avant-Propos



BIOPUCE (n.f.) : (Biochim.) support d'analyse miniaturisé constitué d'une petite plaque de verre, de silicium ou d'un autre matériau inerte, sur laquelle ont été fixées des molécules biologiques (fragments d'ADN [*puces à ADN*], protéines [*puces à protéines*]), permettant d'en révéler la présence dans l'échantillon mis en contact avec la plaque. Ses applications concernent le diagnostic médical, la recherche pharmaceutique, le contrôle agro-alimentaire, les sciences de l'environnement, etc.

Le Petit Larousse illustré, 100ème édition, 2004.

Introduction

La course à la miniaturisation en microélectronique n'a pas épargné le monde du vivant. Depuis une dizaine d'années, sont apparus des termes tels que *biopuces*, *laboratoires-sur-puce*, ou encore *nanobiotechnologies*. Faisant miroiter des possibilités formidables dans les domaines du diagnostic médical, de la recherche pharmaceutique ou encore de l'environnement, les microsystèmes pour la biologie sont porteurs de nombreux espoirs.

Le CEA s'est engagé depuis le début des années 1990 dans la R&D de microsystèmes pour l'analyse biologique. À travers des sites tels que le Génopôle d'Évry et le CEA-Grenoble, de nombreux ingénieurs, chercheurs et techniciens travaillent au carrefour de la biologie, la chimie, la microélectronique, etc.

C'est dans ce contexte hautement pluridisciplinaire que s'est déroulé ce stage de quatrième année, au laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes.

Dans une première partie, nous expliquerons le contexte et les objectifs du stage. Nous présenterons d'abord la structure de recherche que constitue le CEA-Grenoble. Nous nous intéresserons également aux biopuces à fluorescence et aux puces à protéines.

Dans une seconde partie, nous détaillerons le développement d'un immuno-test sur support solide. Nous rappellerons quelques bases d'immunologie, puis nous décrirons le modèle biologique utilisé et le travail réalisé sur l'optimisation du test. Nous présenterons aussi quelques moyens peu courants de caractérisation de l'interaction antigène – anticorps.

Enfin, nous nous intéresserons au travail effectué sur la silanisation en phase vapeur, développé dans un premier temps sur support plan, puis appliqué au projet Biochiplab™. Nous présenterons les enjeux de ce projet, et les étapes de validation par lesquelles nous sommes passés avant de travailler sur des microsystèmes.

Chapitre 1

Contexte et Objectifs

« The skill of writing is to create a context in which other people can think. »

Edwin Schlossberg

1.1 Les microtechnologies pour la Biologie et la Santé au CEA-Grenoble

Le CEA est un « *établissement de caractère scientifique, technique et industriel* »¹. Il est placé sous les tutelles des ministères chargés de la Recherche, de la Défense, de l'Économie, des finances et de l'industrie. Le caractère industriel est très présent au CEA qui, par statut, « *mène une politique de valorisation tendant à faire bénéficier l'industrie du résultat de ses travaux* »².

1.1.1 Activités du CEA-Grenoble

Les pôles opérationnels du CEA sont divisés en plusieurs Directions, telles que la Direction de la Recherche Technologique (DRT) ou la Direction des Sciences du Vivant (DSV). Le Léli (Laboratoire d'électronique et des technologies de l'information), qui appartient à la DRT, est un centre de recherche et de transfert technologique dans les domaines de la microélectronique, des microtechnologies, de l'optronique et de l'instrumentation.

Le Département des microTechnologies pour la Biologie et la Santé (DTBS) est une structure du Léli dédiée à la recherche en micro et nanotechnologies pour le diagnostic, la santé, les sciences de la vie et l'environnement. Le DTBS regroupe et développe des compétences dans les domaines des microsystèmes (chimie de surface, microfluidique, électrochimie...) et de l'imagerie (détection optique, détection X et γ ...). Cette pluridisciplinarité permet au DTBS de répondre à des projets visant à intégrer de nombreuses fonctions dans des microsystèmes. Le DTBS collabore avec plusieurs partenaires industriels, notamment avec bioMérieux sous la forme d'une équipe commune.

¹Ordonnance n° 45-2563 du 18 octobre 1945 modifiée portant création du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) (www.dsi.cnrs.fr/RMLR/textesintegaux/volume1/144-o45-2563.htm). Art. 1^{er} (modifié par le décret n° 70-878 du 29 septembre 1970).

²Décret n° 70-878 du 29 septembre 1970 modifié relatif au Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) (www.dsi.cnrs.fr/RMLR/textesintegaux/volume1/144-d70-878.htm). Art. 2 (modifié par les décrets n° 81-300 du 31 mars 1981 et n° 82-734 du 24 août 1982).

1.1.2 Organigramme

L'organigramme de la FIG. 1.1 présente les différentes structures avec lesquelles nous avons mené nos travaux. Le stage a été effectué dans le Service BioSystem on Chip (SBSC), au sein du Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes (LFCM). Les collaborations ont été nombreuses et régulières avec son frère jumeau, le Laboratoire Composants Intégrés pour le Vivant (LCIV), qui s'occupe du volet technologique.

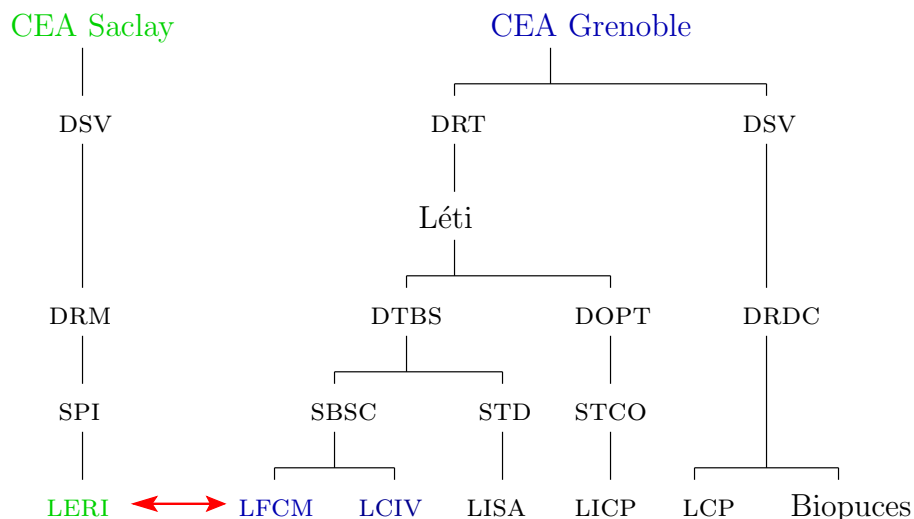


FIG. 1.1 – Extrait de l'organigramme du CEA-Grenoble. En raison de la complexité de l'organisation, seules les structures ayant un rapport avec ce stage ont été représentées. Notre principale collaboration a été réalisée avec le LERI du CEA-Saclay.

1.1.3 Le Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes

Créé fin 2003, le Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes (LFCM), sous la direction de Françoise VINET, est spécialisé dans le développement de chimies de surface pour conférer des propriétés spécifiques : adsorption / anti-adsorption, réactivité vis à vis de molécules chimiques ou biologiques, hydrophobie / hydrophilie, etc.

Les applications concernent les biopuces et les microsystèmes pour la biologie (PCR³, digestion enzymatique, etc.), dans des domaines aussi variés que la génomique (puces à ADN), la protéomique (puces à protéines) et la glycomique (puces à sucres).

³*Polymerase Chain Reaction* : méthode d'amplification de l'ADN.

1.2 Les biopuces à fluorescence au LFCM

1.2.1 Fluorescence et fluorophores

Le LFCM travaille beaucoup avec des substances biologiques marquées par des fluorophores. Les *fluorophores* sont des molécules capables d'absorber de l'énergie lumineuse à une certaine longueur d'onde et de la restituer rapidement (< 10 ns) sous forme de lumière fluorescente [1].

Diagramme de JABLONSKI

La fluorescence est le résultat d'un processus en trois étapes se produisant dans certaines molécules appelées fluorophores (en général des hydrocarbures polyaromatiques ou des hétérocycles) [2]. Le mécanisme de fluorescence est illustré sur la FIG. 1.2 (Diagramme de JABLONSKI).

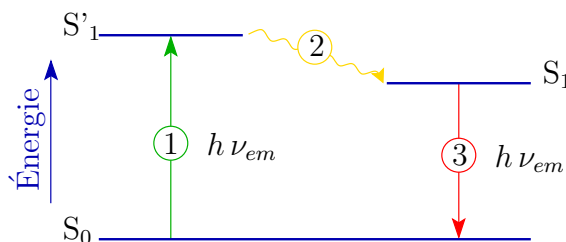


FIG. 1.2 – Diagramme de JABLONSKI. (1) excitation du fluorophore par un photon d'énergie $h\nu_{ex}$; (2) durée de vie de l'état excité ; (3) émission de fluorescence par un photon d'énergie $h\nu_{em}$.

- (1) **Excitation** : Un photon d'énergie $h\nu_{ex}$ fourni par une source extérieure (lampe à incandescence, laser) est absorbé par le fluorophore, créant ainsi un état électronique excité (S'_1).
- (2) **Durée de vie de l'état excité** : L'état excité a une durée de vie finie τ (1 à 10 ns). Durant cette période, le fluorophore subit des changements conformationnels, et est également sujet à une multitude d'interactions possibles avec son environnement. Tout d'abord, l'énergie de S'_1 est partiellement dissipée, atteignant ainsi par relaxation un état électronique excité d'énergie moindre (S_1), à partir duquel l'émission de fluorescence va avoir lieu. Ensuite, différents processus dépeuplent le niveau S_1 vers le niveau original S_0 : *quenching*, *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) [3], etc. Le rendement quantique Φ de fluorescence, qui est le rapport entre la quantité de photons émis et la quantité de photons absorbés, permet de mesurer l'efficacité relative du processus de fluorescence par rapport aux autres modes de désexcitation.
- (3) **Émission de fluorescence** : Un photon d'énergie $h\nu_{em}$ est émis, ramenant ainsi le fluorophore à son état original S_0 . À cause de la dissipation d'énergie produite durant la durée de vie de l'état excité, l'énergie du photon réémis est plus faible que celle du photon absorbé : $h\nu_{em} < h\nu_{ex}$. La différence d'énergie (ou de longueur d'onde) représentée par $h\nu_{ex} - h\nu_{em}$ est appelée Loi de STOKES (cf. FIG. 1.3).

Déplacement de STOKES

Le déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées est fondamental pour l'utilisation de la fluorescence comme moyen de lecture, car il permet la séparation et la détection du signal spécifique émis par le fluorophore.

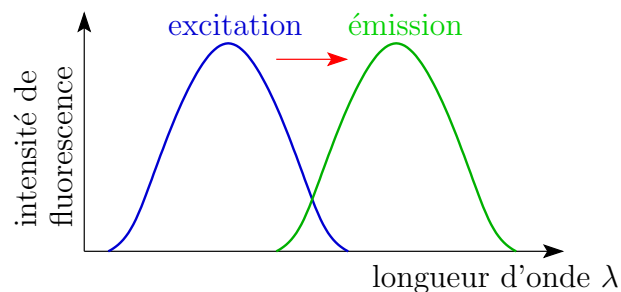


FIG. 1.3 – Loi de STOKES : déplacement du spectre d'émission de la fluorescence vers des longueurs d'onde plus élevées (*i.e.* des énergies plus faibles).

Bruit de fond et bleaching

Lors de la lecture, le signal reçu n'est pas exclusivement composé du signal que l'on souhaite observer. La présence de bruit de fond est gênante car elle diminue la sensibilité de la mesure. Un autre phénomène gênant est le *photobleaching* ou plus simplement *bleaching* : sous une forte ou longue illumination, la destruction irréversible des fluorophores devient le facteur limitant de la détection par fluorescence (cf. 2.3).

Appareils de lecture de fluorescence

Il existe différents outils de lecture de fluorescence, parmi lesquels nous retiendrons le microscope à épifluorescence et le scanner à fluorescence, utilisés couramment par le LFCM. Au cours de cette étude, nous avons utilisé un scanner Genepix 4000B (Axon) (FIG. 1.4), avec l'échelle « *Rainbow 2* » (FIG. 1.5). Cette échelle dispose de 65536 niveaux de gris que l'on affiche en fausses couleurs.



FIG. 1.4 – Scanner à fluorescence GenePix 4000B (Axon) utilisé au laboratoire Biopuces et au LFCM



FIG. 1.5 – Palette de fluorescence en niveaux de gris et en fausses couleurs (*Rainbow 2*).

1.2.2 Compétences, savoir-faire et outils du LFCM

La chimie CEA-2

Les chercheurs du LFCM ont développé, mis au point et breveté une chimie de greffage de molécules biologiques [4]. Cette chimie, intitulée CEA-2, est basée sur le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane (FIG. 1.6). Les différentes étapes du protocole sont illustrées sur la FIG. 1.7.

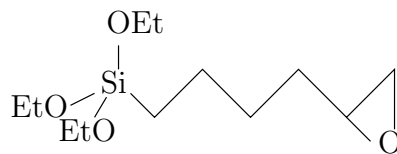


FIG. 1.6 – Structure chimique du 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane ($C_{12}H_{26}O_4Si$). Les groupes éthoxy Et représentent des groupes C_2H_5 .

L'objectif de cette chimie de surface est de créer une interface entre le substrat inorganique (verre, oxyde métallique, etc.) et les molécules biologiques. Cette étape de *fonctionnalisation* permet d'introduire des *fonctions chimiques*⁴ particulières, réactives vis à vis des sondes biologiques. En général, on utilise comme substrats des lames de verre telles que des lames de microscope.

Après une activation de la surface en milieu basique, la silanisation permet le greffage du silane par création de liaisons Si – O – Si. Par hydrolyse acide, on ouvre la fonction époxyde du silane en fonction diol. La dernière étape, l'oxydation du diol en aldéhyde, s'effectue juste avant le greffage des substances biologiques.

Cette chimie permet le greffage de sondes biologiques possédant des fonctions amine NH_2 réactives vis à vis des fonctions aldéhyde du silane.

⁴Par exemple, le groupement fonctionnel $-COOH$ fournit la fonction *acide* aux molécules dans lesquelles il se trouve.

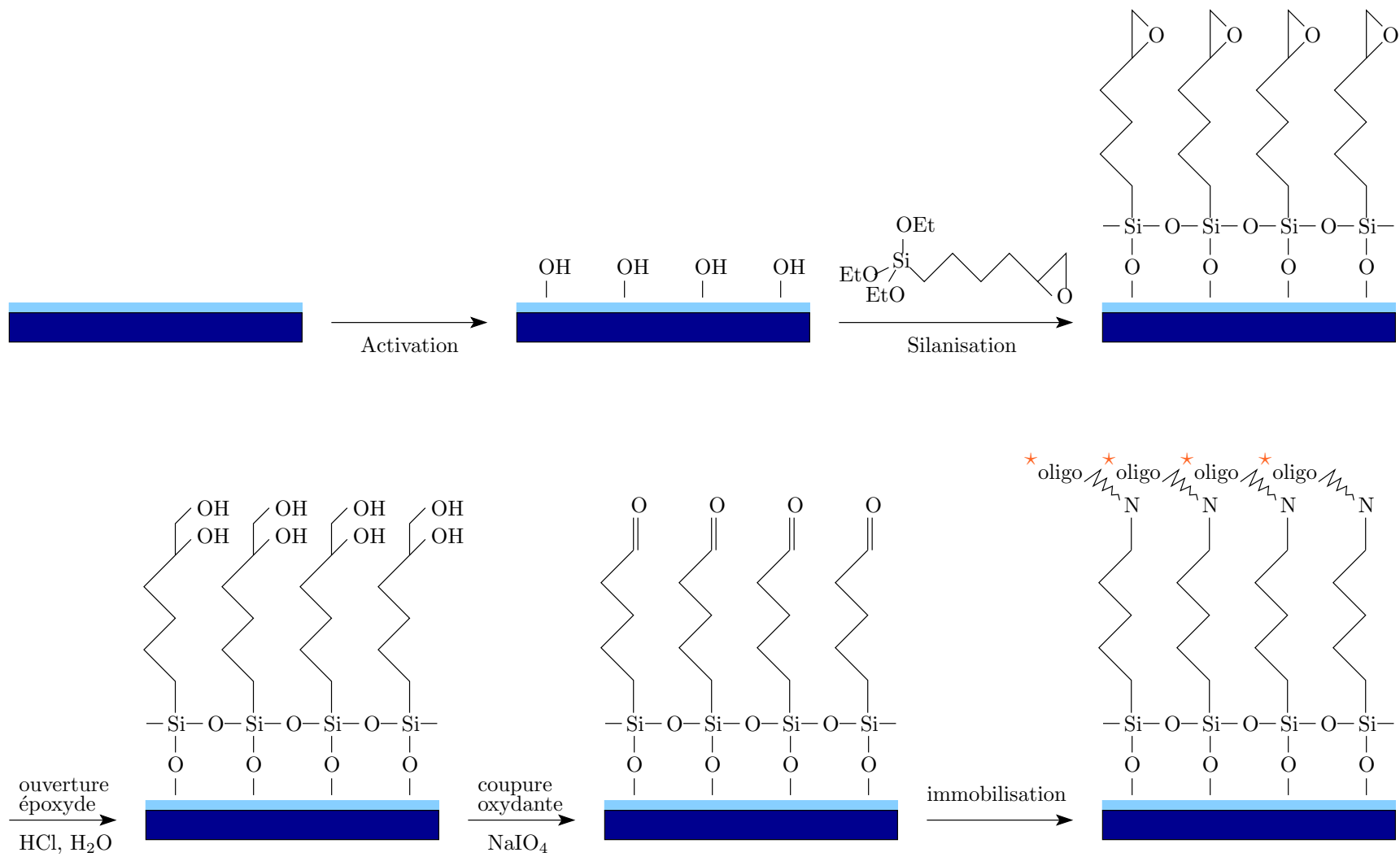


FIG. 1.7 – Protocole de la chimie CEA-2

Pour ce faire, le LFCM possède un réacteur de silanisation (FIG. 1.8) permettant la fonctionnalisation d'une grande quantité de substrats simultanément. Le réacteur est constitué d'un grand dessiccateur, modifié pour pouvoir accueillir jusqu'à quarante lames de verre ou 25 wafers de 100 mm. Ce traitement par « lots » permet notamment d'améliorer la reproductibilité des procédés.



FIG. 1.8 – Réacteur de silanisation

Le spotting

Afin d'augmenter la densité de tests sur un même substrat, les sondes biologiques sont *spottées*, *i.e.* déposées sous forme de très petites gouttes.

Le LFCM dispose d'un robot de dépôt Packard BioChip Arrayer (FIG. 1.9) doté de quatre têtes piézoélectriques, capables de déposer les solutions sans entrer en contact avec la surface. Le dispositif fonctionne par un ensemble de pompes et de capteurs de pression.

Les gouttes ont un volume d'environ 350 pL, et quittent la tête piézo avec une énergie cinétique inférieure à l'énergie de surface du substrat (de sorte que la goutte reste « entière » en entrant en contact avec la surface). Selon le type de surface, le diamètre moyen des spots ainsi créés peut varier. Dans notre cas, il est voisin de 150 μm .

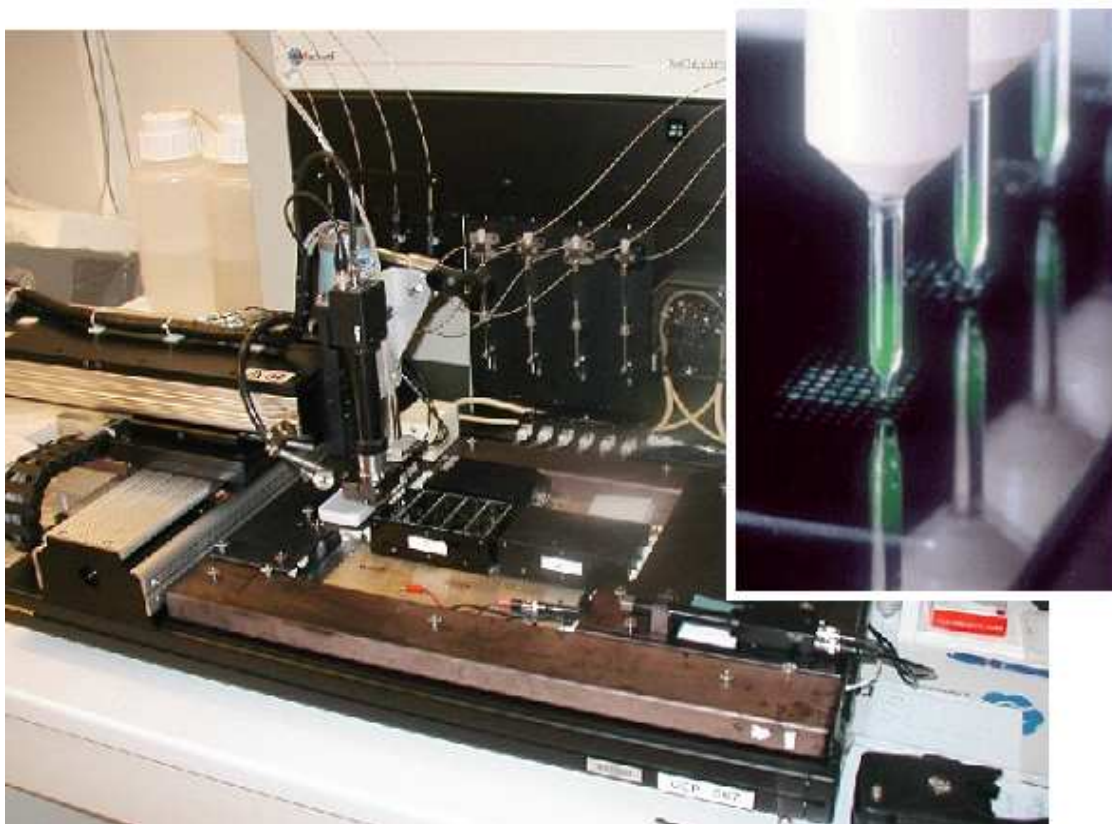


FIG. 1.9 – Robot Packard BioChip Arrayer. En insert, les têtes piézoélectriques.

1.3 Les biopuces à protéines et à peptides

1.3.1 Une exigence de haut débit

Les équipes de recherche et les entreprises de biotechnologies sont constamment à la recherche d'outils leur permettant d'effectuer des tests biologiques rapides, sensibles et à grande échelle [5].

Dans ce contexte, les biopuces ont naturellement leur place. Leur format miniaturisé permet une très forte densité de sondes biologiques, *i.e.* de substances utilisées afin de déterminer la présence de substances complémentaires dans un échantillon. Cette forte densité permet en outre d'utiliser une faible quantité de matière biologique.

1.3.2 De multiples applications

L'application des puces à protéines la plus fréquemment avancée est certainement le diagnostic médical [6]. Les sociétés pharmaceutiques sont d'ailleurs très engagées dans la recherche menée sur les puces à anticorps et à antigènes, car elles constituent un outil efficace et bon marché pour la découverte de nouveaux remèdes.

Un autre domaine de recherche en plein essor est l'analyse des interactions entre protéines [7]. Nous développerons ce point au chapitre 3.

Les applications sont réellement multiples : outre le diagnostic et la recherche de médicaments, on pense à l'analyse de l'expression du génome [8], aux contrôles d'hygiène agro-alimentaires, à la protection de l'environnement *via* la lutte contre la pollution, aux enquêtes policières, etc.

Les puces à anticorps intéressent particulièrement les chercheurs [9] et visent, dans l'avenir, à remplacer les célèbres tests ELISA⁵ [10, 11], pour l'instant plus sensibles, mais plus complexes et beaucoup plus longs à mettre en œuvre.

⁵ELISA : *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*, test immunologique très couramment utilisé

1.4 Objectifs

1.4.1 Développement d'un immuno-test sur chimie CEA-2

La chimie CEA-2 a fait ses preuves dans le domaine des biopuces à ADN, et elle est utilisée de façon standard pour l'immobilisation de sondes oligonucléotides. Cependant, son utilisation pour des applications type puces à protéine restait à démontrer, et c'était l'un des objectifs de ce stage : démontrer la faisabilité d'un immuno-test sur chimie CEA-2. Les premières expériences effectuées au LERI fonctionnaient en capillaires, mais n'étaient pas satisfaisantes sur substrat plan.

Le premier objectif de ce stage consistait donc en l'adaptation sur lame de verre du protocole fonctionnant en capillaires. L'étude des paramètres critiques était également indispensable. Ces deux points feront l'objet du chapitre 2. Une fois la faisabilité établie et les paramètres décisifs identifiés et stabilisés, la phase d'optimisation serait confiée à une autre stagiaire, Isabelle MINGAM, mais resterait néanmoins l'une de nos préoccupations.

1.4.2 Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur

Le second objectif majeur de ce stage était le développement d'un protocole de silanisation CEA-2 en phase gazeuse, sur lequel portera le chapitre 3. Une fois le protocole établi, des validations sur lames de verre étaient nécessaires afin de le comparer à la chimie « classique » réalisée en phase liquide. Ces validations ont porté sur le modèle d'immuno-test développé en parallèle.

Enfin, une fois le protocole validé, l'objectif final était la fonctionnalisation de microsystemes, notamment dans le cadre du projet BiochiplabTM (microsystemes pour la protéomique).

Chapitre 2

Immuno-test sur chimie CEA-2

« If you don't ask the right questions, you don't get the right answers. A question asked in the right way often points to its own answer. Asking questions is the ABC of diagnosis. Only the inquiring mind solves problems. »

Edward Hodnett

Objectif : Utiliser les compétences et le savoir-faire du LFCM dans le domaine des puces à ADN pour développer un modèle de puces à anticorps.

2.1 Notions de base d'immunologie

Les paragraphes suivants ne constituent qu'un bref rappel des notions d'immunologie nécessaires à la compréhension des travaux effectués au cours de ce stage. Pour des informations plus complètes et plus précises, on pourra consulter l'ouvrage de référence *Immunology* de ROITT *et al.* [12].

2.1.1 Anticorps et antigènes

Les anticorps

Un *anticorps* est une molécule spécifique de la famille des immunoglobulines, produite par les lymphocytes B et les plasmocytes, en réaction à la présence dans l'organisme d'un antigène [13].

L'anticorps a la propriété de pouvoir se combiner avec l'antigène à l'origine de sa production, pour le neutraliser.

L'anticorps est une protéine très fragile portant une partie constante Fc (commune à tous les anticorps) et deux parties variables Fab (FIG. 2.1). Ces parties variables permettent la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps. Les anticorps dits « monoclonaux » ont des parties variables identiques.

Les antigènes

Un *antigène* est une molécule susceptible d'être reconnue de façon spécifique par le système immunitaire, et d'induire la production d'anticorps spécifiques.

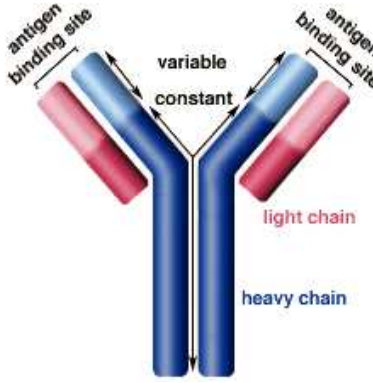


FIG. 2.1 – Schéma d'un anticorps [11]

2.1.2 La reconnaissance antigène – anticorps [12]

Épitope et Paratope

Chaque anticorps se fixe sur une zone de la molécule d'antigène appelée *déterminant antigénique*, ou *épitope*. Un antigène peut posséder une mosaïque d'épitopes différents ou bien des épitopes répétitifs. Les anticorps sont spécifiques d'un épitope, et non pas de l'ensemble de la molécule d'antigène.

Ce sont les acides aminés situés aux extrémités des régions hypervariables des régions V_H (H : chaîne lourde) et V_L (L : chaîne légère), situées à l'extrémité du fragment Fab, qui se lient à l'antigène. Ces sites sont appelés *paratopes*.

Interaction anticorps – antigène

De nombreuses liaisons antigène – anticorps participent à l'interaction entre épitope et paratope. Bien que ces forces soient faibles (liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes, forces de VAN DER WAALS et forces électrostatiques), par rapport aux liaisons covalentes, leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée.

Les *liaisons hydrogène* résultent de la formation de ponts hydrogène entre des atomes appropriés. Les *forces électrostatiques* sont dues à l'attraction de deux groupes ioniques de charges opposées. Les *forces de VAN DER WAALS* sont créées par interaction entre différents nuages électroniques (dipôles oscillants induits). Enfin, les *liaisons hydrophobes*, qui peuvent contribuer pour moitié à la force de liaison antigène – anticorps, sont produites par l'association de groupements non polaires et hydrophobes, d'où les molécules d'eau sont exclues.

Affinité des anticorps

La force de liaison antigène – anticorps est appelée *affinité*. Elle représente la somme des forces attractives et répulsives énoncées précédemment. Les liaisons non covalentes entre un anticorps et l'épitope reconnu sont dissociables ; l'ensemble de la liaison entre un anticorps et un antigène est donc une réaction réversible. Dans ce cas, la loi d'action de masse peut être appliquée, et la constante d'équilibre K calculée, selon la formule suivante :

$$K = \frac{[Ac Ag]}{[Ac][Ag]} \quad (2.1)$$

Cinétique des réactions antigène – anticorps

La cinétique de l'association et de la dissociation des anticorps représente un autre paramètre important pour comprendre les activités biologiques des anticorps. Par cinétique, on entend la mesure de la constante d'association K_{on} et de la constante de dissociation K_{off} .

À l'équilibre, le rapport de ces deux constantes indique la constante d'équilibre (affinité de l'anticorps) :

$$K = \frac{K_{on}}{K_{off}} \quad (2.2)$$

2.2 Développement d'un immuno-test sur la Substance P

2.2.1 Modèle biologique choisi

La Substance P

Découverte en 1931 par VON EULER et GADDUM, la *substance P* (SP) a dû attendre les années 70 pour voir sa structure révélée par LEMBECK [14]. Celui-ci a démontré qu'elle est composée de onze acides aminés, dont la séquence est la suivante (on pourra se reporter au TAB. 2.1 pour la signification des symboles des acides aminés) :



La SP (FIG. 2.2) est un neurotransmetteur de la famille des neurokinines (NK) : elle est synthétisée par la cellule nerveuse, le neurone, et est capable d'exciter d'autres neurones avoisinants. Cette excitation se fait grâce aux récepteurs NK1, NK2 et NK3, auxquels la SP peut spécifiquement se lier [15].

La SP exerce de nombreux effets sur pratiquement tous les systèmes (cardio-vasculaire, digestif, respiratoire, uro-génital, immunitaire, etc.). Dans le système nerveux central, elle participe aux mécanismes de la transmission de la douleur [16].

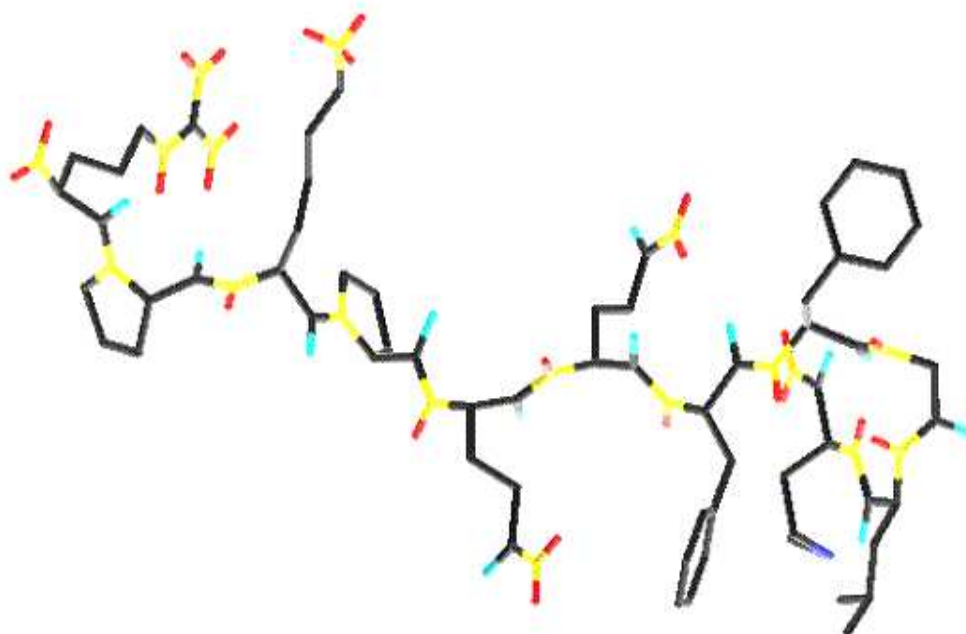


FIG. 2.2 – Structure de la substance P

Substances biologiques

Les substances biologiques dont nous disposons nous ont été fournies par le Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunoanalyse (DSV / DRM / SPI / LERI), qui travaille notamment sur le dosage immunofluorescent de la substance P. Nous avons principalement collaboré avec Laure-Marie NEUBURGER [3], qui travaille sur ce modèle en capillaires.

A	Ala	Alanine	M	Met	Methionine
B	Asx	Asparagine ou Acide aspartique	N	Asn	Asparagine
C	Cys	Cystéine	P	Pro	Proline
D	Asp	Acide Aspartique	Q	Gln	Glutamine
E	Glu	Acide glutamique	R	Arg	Arginine
F	Phe	Phénylalanine	S	Ser	Sérine
G	Gly	Glycine	T	Thr	Thréonine
H	His	Histidine	V	Val	Valine
I	Ile	Isoleucine	W	Trp	Tryptophane
K	Lys	Lysine	Y	Tyr	Tyrosine
L	Leu	Leucine	Z	Glx	Glutamine ou Acide glutamique

TAB. 2.1 – Symboles des acides aminés [17]

L'anticorps monoclonal mAb SP31 ($\sim 150 \text{ kDa}^1$) est un anticorps dirigé contre la substance P. Les travaux effectués dans ce laboratoire ont permis de déterminer la séquence reconnue par cet anticorps [18]. Elle est constituée de cinq acides aminés et est représentée en rouge sur la séquence de la SP :

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-**Phe-Phe-Gly-Leu-Met**

Le peptide LMN1 (1907 Da) a été synthétisé selon une séquence analogue à celle de la SP. Sa séquence est la suivante :

*Lys(Fluorophore)-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-**Phe-Phe-Gly-Ala-Met-CONH₂***

Les modifications apportées par rapport à la substance P sont indiquées en italique.

La Leucine en position 10 sur la SP (Leu^{10}) a été remplacée par l'Alanine : la reconnaissance par l'anticorps mAb SP31 est préservée, mais avec une moindre affinité (qui reste néanmoins très bonne). Cela permet de favoriser la compétition avec la SP dans le cadre des dosages par compétition de cibles non marquées effectués au LERI.

Une Alanine a été substituée à la Lys^3 pour limiter le marquage fluorescent à la partie N-terminale du peptide. En effet, la réaction de marquage se fait par réaction des amines libres avec les fluorophores sous forme d'esters actifs. De plus, cette partie a été rallongée par des résidus hydrophiles pour compenser le caractère hydrophobe de la **Biotine** (incorporée sur la Lys^4 pour le peptide biotinylé) et des **Fluorophores** (sur la Lys^1 N-terminale).

Enfin, la fonction amine **NH₂** du côté C-terminal permet la fixation du peptide sur la chimie de greffage.

Lecture indirecte : le couple streptavidine – biotine

Nous disposons d'anticorps et d'antigènes biotinylés : une biotine est fixée sur leur structure. La biotine est une petite vitamine, la vitamine H (FIG. 2.3). La biotine possède une très forte affinité ($K \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$) avec la streptavidine, une protéine tétramérique ($4 \times 13 \text{ kDa}$) (FIG. 2.4). Nous disposons au laboratoire de streptavidine marquée avec le fluorophore Cy3 (cf. TAB. 2.2), avec laquelle il est possible de révéler la présence de biotine (et donc de substances biotinylées).

¹Dalton (Da) : unité de poids moléculaire correspondant à la masse d'un atome d'hydrogène, soit environ $1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$

La lecture est alors indirecte ; une étape de révélation est nécessaire. Cette révélation implique une étape supplémentaire dans le procédé, et donc un séchage supplémentaire. Au vu des conséquences du séchage sur les substances biologiques (cf. 2.2.3), cette étape est à éviter.

Par suite, nous avons tenté de prérévéler les cibles biotinylées : nous avons fait réagir la streptavidine-Cy3 en excès avec les cibles biotinylées. Ainsi, l'étape de révélation est évitée.

La lecture indirecte a un autre inconvénient : le fluorophore streptavidiné ne fait pas la distinction entre une biotine fixée sur un anticorps et une biotine fixée sur un peptide. Cela amène, lors de certains tests, une indétermination qui ne peut être levée que par l'utilisation de substances directement fluorescentes (*i.e.* marquées au préalable avec un fluorophore, dont l'excès est ensuite extrait de la solution par purification).

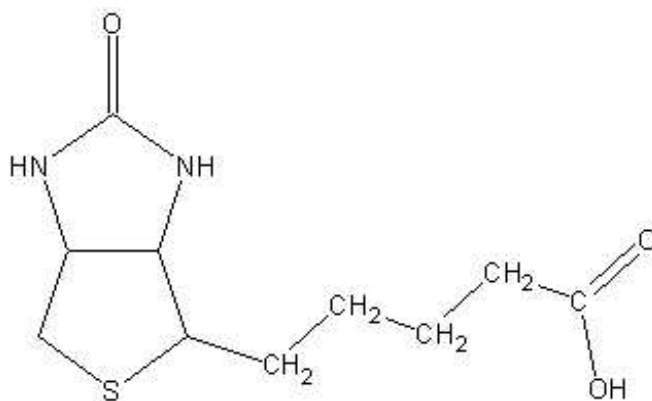


FIG. 2.3 – Structure chimique de la biotine

Lecture directe et Fluorophores

Les peptides fournis par le LERI sont pour la plupart marqués avec des fluorophores : tétraméthylrhodamine (TMR) et fluorescéine. La fluorescéine n'est pas compatible avec le scanner : les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ne correspondent pas (cf. TAB. 2.2). La TMR, quant à elle, peut être lue même si toute la fluorescence n'est pas détectée.

Plus tard, nous avons obtenu du LERI des anticorps mAb SP31 et des peptides LMN1 marqués à l'Alexa 532, qui est un fluorophore puissant, résistant et lisible sur notre scanner.

Fluorescéine	$\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$	$5 < \text{pH} < 8$
Tétraméthylrhodamine (TMR)	$\lambda_{ex} = 555 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$	–
Cyanine 3 (Cy3)	$\lambda_{ex} = 548 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 562 \text{ nm}$	–
Alexa 532	$\lambda_{ex} = 531 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 554 \text{ nm}$	$4 < \text{pH} < 10$

TAB. 2.2 – Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorophores [2]

2.2.2 Protocole-type

Le protocole suivant a été établi en adaptant le protocole utilisé au LERI par Laure-Marie NEUBURGER [3]. Le schéma de la FIG. 2.5 illustre les différentes étapes du procédé.

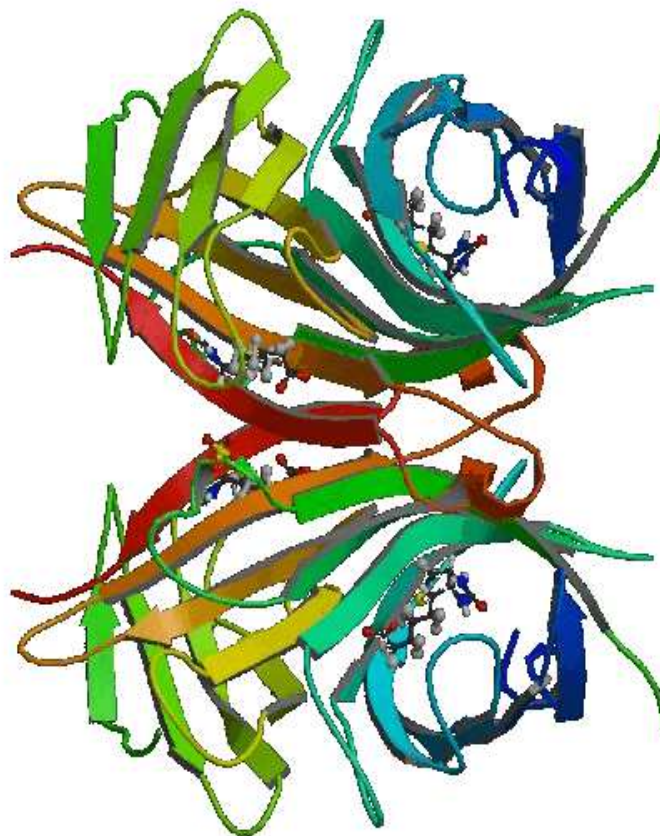


FIG. 2.4 – Complexe Streptavidine – Biotine [19]

Chimie de greffage. Les supports utilisés sont des lames de verre, type lames de microscope. Ces lames subissent les étapes successives de la chimie CEA-2 jusqu’au stade diol où elles sont conservées. Avant le spotting, elles sont activées par oxydation et présentent alors une surface aldéhyde.

Immobilisation des sondes. Les sondes sont déposées sur la surface par spotting grâce au robot de dépôt. L’immobilisation dure une nuit à 4°C et en chambre humide, afin d’éviter l’évaporation des spots.

Lavage et saturation de la surface. La surface est ensuite lavée afin d’ôter l’excédent de solution n’ayant pas réagi. Puis, les sites actifs inoccupés sont saturés avec une solution bloquante pour limiter le bruit de fond en empêchant l’adsorption non spécifique.

Incubation avec les cibles. La solution de cibles est déposée sur la surface et laissée à incuber sous une lamelle en plastique, qui assure la répartition homogène de la goutte sur la surface. L’incubation dure deux heures.

Révélation avec les fluorophores. Certaines cibles sont déjà marquées avec un fluorophore, et dans ce cas l’étape de révélation est inutile. Dans le cas contraire, les cibles sont biotinylées (elles possèdent une biotine, cf. 2.2.1) et doivent être révélées avec un fluorophore streptavidiné. En effet, le couple streptavidine – biotine possède une très forte affinité, et les fluorophores vont donc venir se fixer sur les cibles biotinylées.

Lecture de fluorescence. Enfin, la dernière étape de ce procédé consiste en la caractérisation de l’expérience par lecture de fluorescence au scanner. Les images obtenues sont ensuite analysées à l’aide d’outils statistiques afin de dégager les tendances générales.

Ce protocole a subi des modifications et des améliorations au fur et à mesure des différents tests effectués.

2.2.3 Paramètres biologiques étudiés

Les tests biologiques, en particulier les immuno-tests, sont difficiles à maîtriser et à stabiliser (notion de *reproductibilité*), principalement à cause de leur aspect multiparamétrique : durée et température des différentes étapes, degré d’hygrométrie, protéines de blocage, différents tampons, etc. L’optimisation de ces paramètres représente un travail conséquent et, pour notre modèle, ce travail a été effectué en collaboration avec une autre stagiaire, Isabelle MINGAM, élève-ingénieur en Biochimie de l’INSA de Lyon [20].

Chacun des paramètres a fait l’objet d’une optimisation. Ceux traités plus particulièrement sont détaillés ci-après.

Greffage des substances biologiques – Blocage des sites inoccupés

Les premières expériences ont consisté à vérifier que le greffage des anticorps et des antigènes sur la surface s’effectuait correctement. Pour cela, nous avons spotté des sondes biotinylées puis nous les avons révélées avec de la streptavidine-Cy3 (FIG. 2.6). La biotine et la streptavidine possèdent en effet une très forte affinité. Le schéma de spotting est fourni au TAB. 2.3.

On rappelle que nous disposons de 65536 niveaux de gris apparaissant en fausses couleurs. Les pixels indiquant une forte fluorescence sont artificiellement colorés dans les tons rouge (intensité comprise entre environ 16000 et 65535), tandis que ceux de faible fluorescence (typiquement le bruit de fond, d’intensité inférieure à 1000) ressortent dans les tons bleu-vert. Les spots intermédiaires (moyenne fluorescence) apparaissent en jaune-orangé. Enfin, les spots blancs sont saturés, c’est à dire que leur intensité est supérieure à 65535.

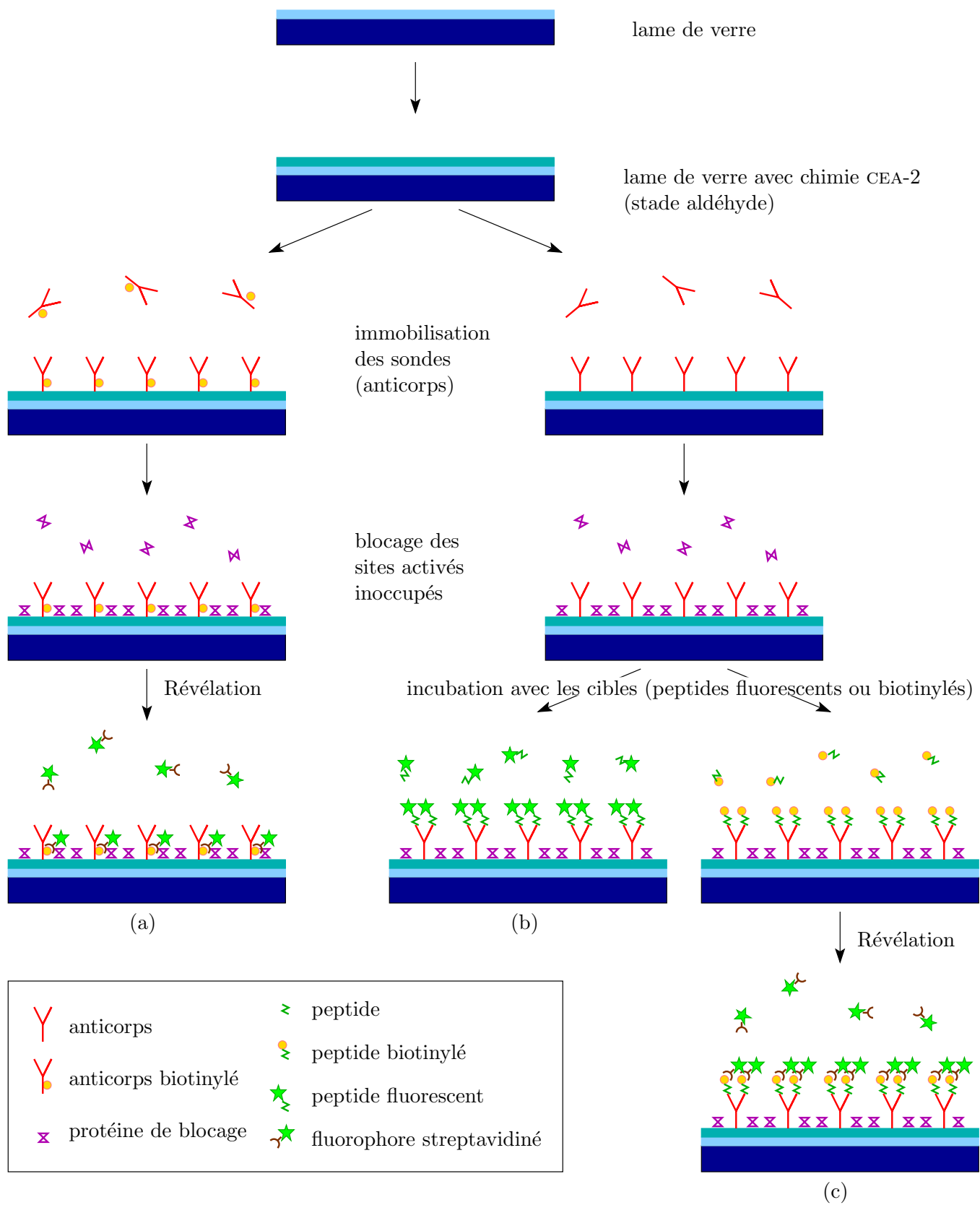


FIG. 2.5 – Schéma illustrant les différentes étapes du protocole de l'immunotest et les tests possibles. (a) Vérification indirecte, par un fluorophore streptavidiné, du greffage d'anticorps biotinylés ; (b) Lecture directe de la fixation de peptides fluorescents sur des anticorps ; (c) Révélation indirecte, par un fluorophore streptavidiné, de la fixation de peptides biotinylés sur des anticorps.

Comme attendu, les seules rangées montrant une réelle fluorescence sont les rangées d'anticorps biotinylés (FIG. 2.6, lignes 3 et 4) et de peptides biotinylés (FIG. 2.6, lignes 7 et 8).

Les rangées d'anticorps non biotinylés et d'anticorps témoins (FIG. 2.6, resp. lignes 1-2 et 5-6) sont peu fluorescentes : comme les substances immobilisées ne possèdent pas de biotine, la streptavidine-Cy3 ne s'y est pas fixée.

Le contrôle du bruit de fond (signal non spécifique) est primordial dans ce type de test. En effet, la limite de détection est directement liée à ce paramètre. Sur nos surfaces, tous les sites activés des molécules de silane ne sont pas occupés par des sondes, puisque nous les avons déposées sous forme de spots. Si l'on ne bloque pas ces surfaces interspots, les fluorophores ou les substances fluorescentes peuvent s'y accrocher, entraînant alors un fort bruit de fond (signal non spécifique). Les protéines neutres sont connues pour être de bonnes surfaces anti-adsorption, et plusieurs protéines ont été testées [20].

Les résultats sont illustrés en comparant les FIG. 2.6 et FIG. 2.7 : en désactivant la surface interspots avec la BSA, on obtient une intensité de fluorescence de 700, contre 13000 sans désactivation.

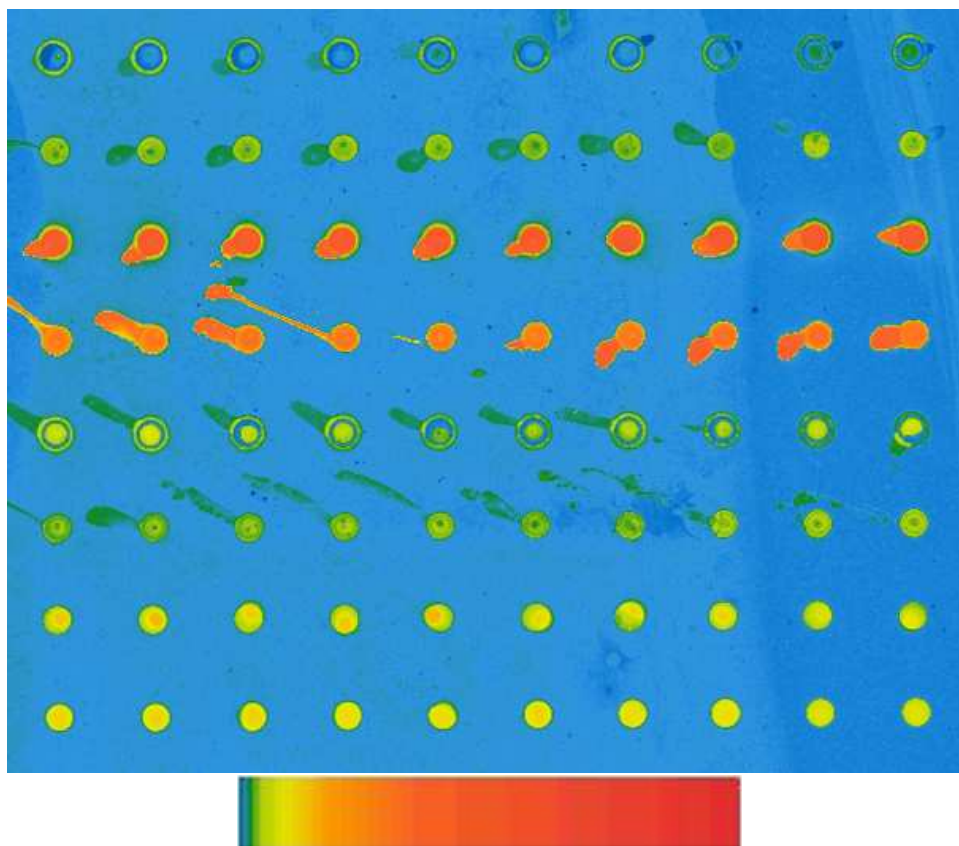


FIG. 2.6 – Révélation Cy3 de sondes biotinylées. Série 1, lame GP-08. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage EIA2, saturation à la BSA (tampon EIA). Séchage à la centrifugeuse. Révélation : streptavidine-Cy3 à 500 nM en tampon PhK, 2h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

Étapes de séchage

Les premières expériences de greffage ont montré que nous parvenions à fixer des anticorps et des peptides sur une surface CEA-2 aldéhyde. Cependant, l'incubation d'anticorps avec des antigènes –

- Anticorps mAb SP31 1 μM
- Anticorps mAb SP31 1 μM , 10% glycérol
- Anticorps biotinylé mAb SP31-biot 0,8 μM
- Anticorps biotinylé mAb SP31-biot 0,8 μM , 10% glycérol
- Anticorps témoin Il2-73 1 μM
- Anticorps témoin Il2-73 1 μM , 10% glycérol
- Peptide LMN1 1 μM
- Peptide LMN1 1 μM , 10% glycérol

TAB. 2.3 – Schéma de spotting de la série 1

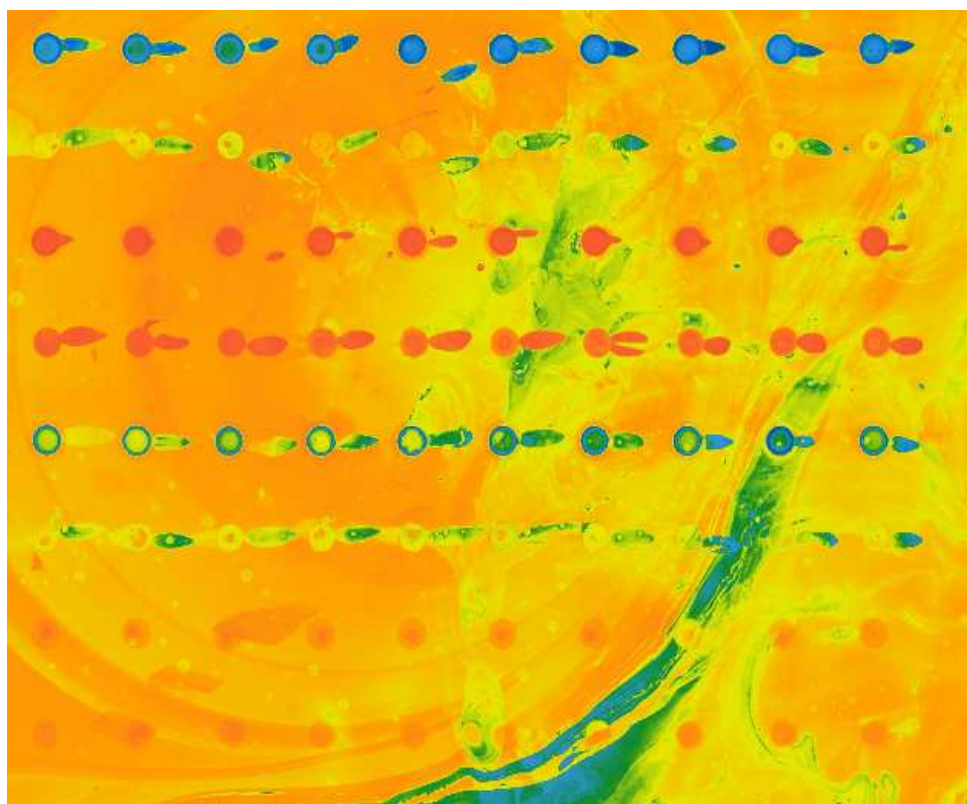


FIG. 2.7 – Révélation Cy3 de sondes biotinylées. Série 1, lame GP-02. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4  C. Rinçage EIA2, pas de saturation de la surface. Séchage à la centrifugeuse. Révélation : streptavidine-Cy3 à 500 nM en tampon Phosphate de Potassium (PhK), 2h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, (450,10).

et inversement – ne fonctionnait pas (ou bien nous ne la détectons pas). On peut observer l'absence de signal sur les deux premières lignes de la FIG. 2.8. Si la reconnaissance anticorps – antigène s'était correctement déroulée, les peptides biotinylés se seraient fixés sur les spots d'anticorps, et le fluorophore streptavidine émettrait un signal en provenance de ces spots.

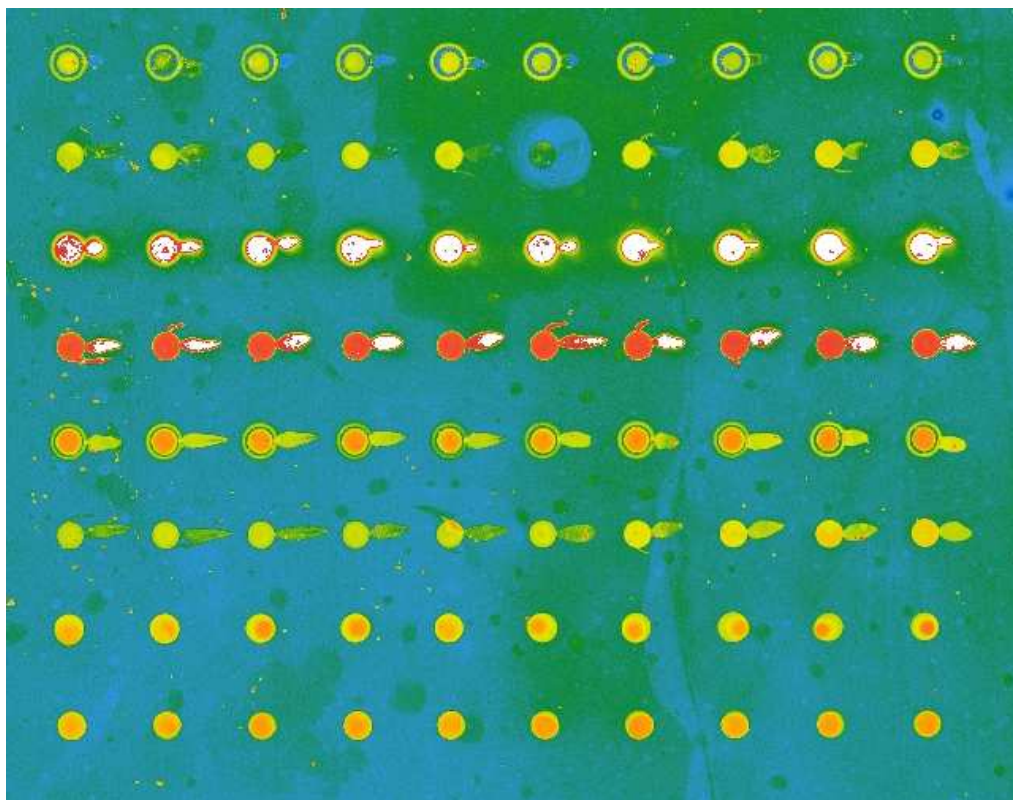


FIG. 2.8 – Révélation Cy3 de cibles biotinylées. Série 1, lame GP-10. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage EIA2, saturation à la BSA (tampon EIA). Séchage à la centrifugeuse. Incubation : peptides biotinylés LMN1 à 500 nM en tampon PhK, 1h à RT. Lavage PhK et séchage à la centrifugeuse. Révélation : streptavidine-Cy3 à 500 nM en tampon PhK, 2h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

Après plusieurs observations et des conversations avec Laure-Marie NEUBURGER, nous avons émis l'hypothèse que le séchage à la centrifugeuse était probablement en cause. En effet, ce séchage, supporté par les brins d'oligonucléotides pour les puces à ADN, est susceptible d'endommager les anticorps, beaucoup plus fragiles. En particulier, le séchage à la centrifugeuse, assez « violent », modifie sans doute l'état de conformation des sites de reconnaissance (paratopes).

Pourtant, au moins une étape de séchage est nécessaire dans notre protocole : l'incubation se fait par dépôt d'une petite quantité de liquide sur la surface, qui est ensuite étalée sous une lamelle plastique.

Un bon compromis semble un séchage « doux » de la surface à la soufflette d'azote. Ainsi, l'intégrité des anticorps est conservée, et les étapes d'incubation sont possibles. Le dernier séchage, réalisé par centrifugation avant la lecture de fluorescence, est maintenu.

En effet, les fluorophores, eux, résistent à ce séchage, et la dégradation des anticorps n'est plus problématique à ce stade du procédé.

Pourcentage de glycérol

Un pourcentage de glycérol est ajouté aux solutions de sondes afin de prévenir l'évaporation des spots durant l'immobilisation. Le taux de glycérol utilisé au départ était 10%. Cependant, un trop fort taux de glycérol est susceptible de diminuer l'intensité de fluorescence par la suite. Nous avons donc testé différentes concentrations de glycérol : de 0 à 10% par pas de 2% (FIG. 2.9, resp. lignes 1 à 6). Cette étude a été menée lors de l'immobilisation d'anticorps, incubés avec des peptides LMN1 prérévélés à la streptavidine-Cy3 (cf. 2.2.1). Le schéma de spotting est donné au TAB. 2.4.

Le résultat de cette expérience est le suivant : au moins 2% de glycérol (FIG. 2.9, ligne 2) sont nécessaires pour empêcher l'évaporation totale du spot, observée sans glycérol (FIG. 2.9, ligne 1). D'autre part, 2% suffisent pour avoir des spots nets et homogènes.

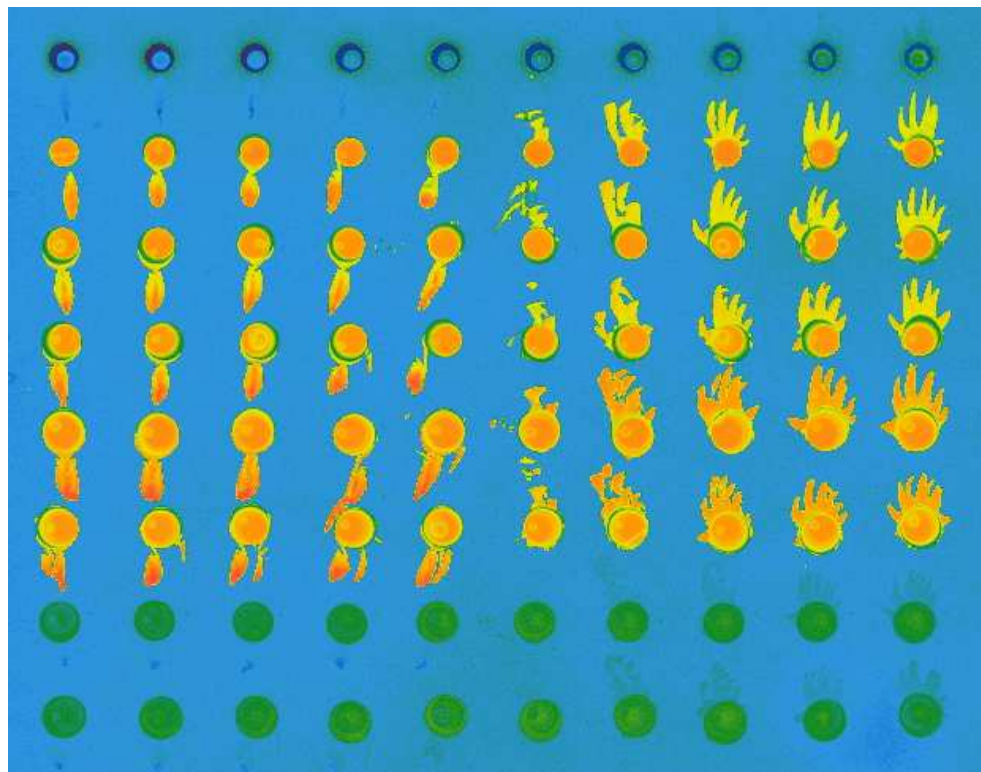


FIG. 2.9 – Différents pourcentages de glycérol. Série 5, lame 217b-03. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C. Glycérol : 0% à 10%. Rinçage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1 (prérévélés à la streptavidine-Cy3) à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

Durée et température d'incubation

La durée et la température d'incubation sont liées : plus la température est élevée (dans la limite de tolérance de l'interaction antigène – anticorps), plus la réaction est rapide. La durée d'incubation nécessaire est réduite, et inversement pour incubation à basse température.

La température d'incubation est généralement la température ambiante (20°C) ou 37°C ; les résultats sont sensiblement les mêmes pour nos expériences (fortes concentrations de cibles).

- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 0% glycérol
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 2% glycérol
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 4% glycérol
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 6% glycérol
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 8% glycérol
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 10% glycérol
- Anticorps témoin Il2-73 1 μ M, 10% glycérol
- Anticorps témoin Il2-73 1 μ M, 10% glycérol

TAB. 2.4 – Schéma de spotting de la série 5

Différentes durées d’incubation ont été testées : deux heures (témoin), cinq heures et dix-huit heures. Les résultats étant identiques, nous avons continué à travailler avec des incubations de deux heures. Cependant, les expériences de lecture en continu (cf. 2.3) ont indiqué que la réaction antigène – anticorps était très rapide. Nous avons donc essayé des incubations de cinq minutes (FIG. 2.10) et une heure (FIG. 2.11).

L’incubation pendant cinq minutes montre des spots spécifiques dont la fluorescence n’est pas homogène, et varie de 17700    30000 (FIG. 2.10, lignes 1 et 2). L’incubation pendant une heure donne des spots homogènes et bien fluorescents, dont l’intensité est de l’ordre de 35000 (FIG. 2.11, lignes 1 et 2). Cela signifie que cinq minutes ne suffisent pas pour atteindre le palier de la saturation en cibles. D’autre part, dans les deux cas, les spots témoins sont à peine distingués (FIG. 2.10 et FIG. 2.11, ligne 3) et le bruit de fond est à peine plus élevé pour l’incubation pendant une heure (~ 500 contre 400 pour 5min).

Une heure d’incubation à 20  C est donc suffisante pour obtenir des spots homogènes et bien fluorescents.

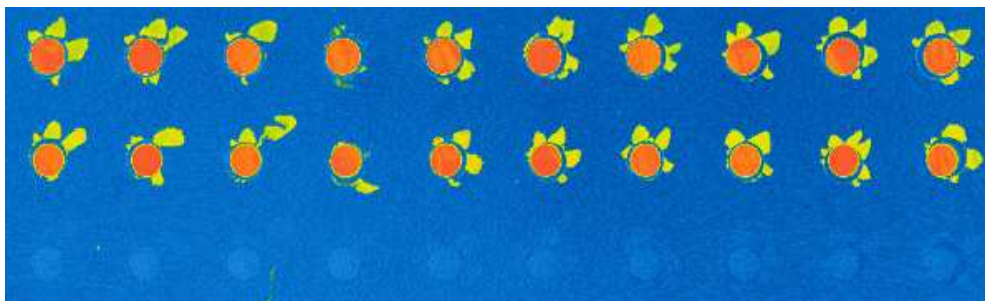


FIG. 2.10 – Incubation pendant 5min. Série 28, lame 236-30. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4  C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween, saturation en PBS - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en tampon PBS - régilait, 5mn à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

Différents tampons

De nombreux tampons sont utilisés au cours du protocole d’immuno-test : tampon de préparation des sondes, tampon de lavage, tampon de saturation de la surface, tampon de préparation des cibles. Les protocoles de préparation des tampons sont donnés en Annexe A.

Le tampon de base, à partir duquel nous préparons les autres tampons par ajout de sels ou autres substances, était au départ le tampon Phosphate de Potassium (PhK). Sa préparation, assez

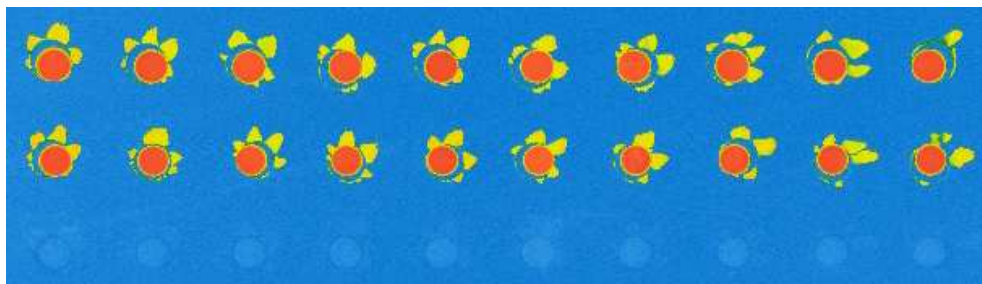


FIG. 2.11 – Incubation pendant 1h. Série 28, lame 236-29. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween, saturation en PBS - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en tampon PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

longue, nous a incité à le remplacer par le *Phosphate Buffer Saline* (PBS), disponible en sachet, à reconstituer en eau désionisée. Les résultats de fluorescence sont équivalents.

Le tampon de préparation des sondes a peu évolué. Différentes concentrations en sels ont été testées [20], et le taux de glycérol a été optimisé (cf. 2.2.3).

Le tampon de lavage le plus efficace est le PBS - Tween 20 (0,1%). Au cours de nos tests, nous avons également testé les tampons PhK - Tween, EIA-2 (tampon phosphate, NaCl, NaN_3) et EIA-3 (PhK, NaCl, NaN_3 , BSA et Tween-20 0,05%).

Ce dernier tampon, EIA3, contient à la fois du Tween, qui est un surfactant utilisé pour laver la surface, et de la BSA, comme protéine de blocage. En effet, certains documents [5] nous ont incité à réaliser le lavage et la saturation de la surface simultanément, de façon à bloquer immédiatement les sites libérés, et ainsi limiter le bruit de fond. Cependant, ce mode opératoire a été abandonné, car ces deux étapes requièrent des durées très différentes : le lavage doit être rapide, afin de ne pas endommager les substances biologiques, tandis que la saturation doit durer au moins deux heures.

Différentes protéines neutres (blocage de la surface) ont été testées. Le lait en poudre, couramment utilisé en biologie, semble plus efficace que la BSA [20].

Enfin, la préparation des cibles peut être effectuée directement dans le tampon de blocage, de façon à limiter l'adsorption non spécifique.

En conclusion, le tampon d'immobilisation est Na_2HPO_4 0,03 M, NaCNBH_3 0,025 M, avec 2% de glycérol pour des anticorps, et 10% pour des peptides. Les lavages sont effectués au PBS - Tween 0,1%, et la saturation en EIA2 - régilait. Les sondes sont préparées en EIA2 - régilait.

2.2.4 Paramètres chimiques étudiés

Greffage à différents stades de la chimie CEA-2

Le stade de greffage habituel d'oligonucléotides sur la chimie CEA-2 est le stade aldéhyde. En effet, la fonction amine NH_2 qui leur est adjointe permet leur fixation sur les fonctions aldéhyde du silane.

Les anticorps et les peptides possèdent eux aussi des fonctions amine NH_2 . Notre choix pour la chimie de greffage s'est donc naturellement porté sur le stade aldéhyde (FIG. 2.14). Cependant, nous avons voulu vérifier que ce stade de la chimie était bien le stade idéal. Nous avons donc tenté de greffer des anticorps et des peptides à deux autres stades de la chimie : les stades époxyde (FIG. 2.12) et diol (FIG. 2.13).

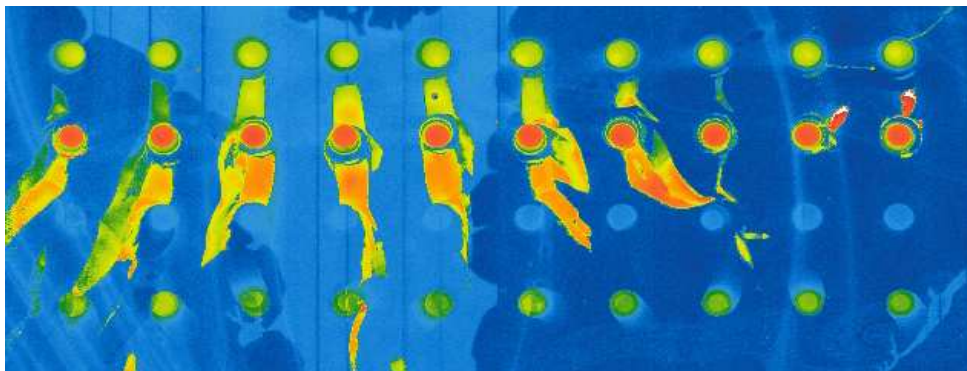


FIG. 2.12 – Greffage au stade époxyde. Série 4, lame 216-31. Immobilisation : glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1 (prérévélés à la streptavidine-Cy3) à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à 37°C. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).



FIG. 2.13 – Greffage au stade diol. Série 4, lame 216-07. Immobilisation : glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1 (prérévélés à la streptavidine-Cy3) à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à 37°C. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

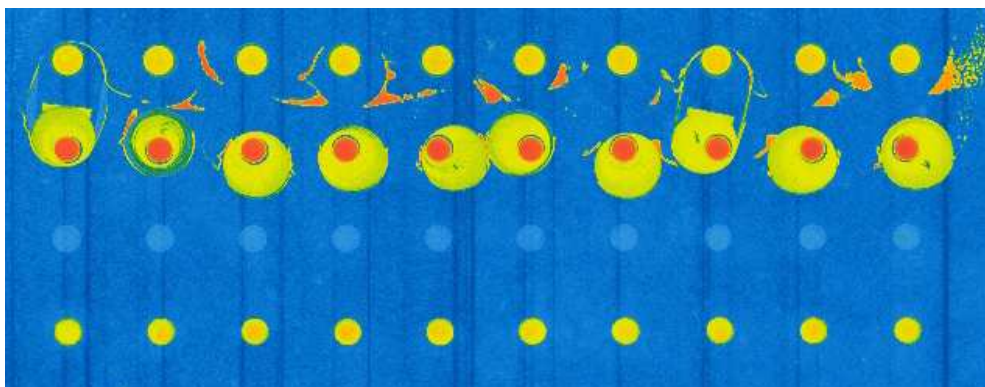


FIG. 2.14 – Greffage au stade aldéhyde (témoin). Série 4, lame 216-06. Immobilisation : glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1 (prérévélés à la streptavidine-Cy3) à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à 37°C. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 10% glycérol
- Anticorps biotinylé mAb SP31-biot 0,8 μ M, 10% glycérol
- Anticorps témoin Il2-73 1 μ M, 10% glycérol
- Peptide LMN1 1 μ M, 10% glycérol

TAB. 2.5 – Schéma de spotting de la série 4

L’immobilisation au stade diol (FIG. 2.13) conduit à des spots plus larges et moins fluorescents. Le bruit de fond est légèrement plus élevé.

L’immobilisation au stade époxyde (FIG. 2.12) fait apparaître des inhomog  nit  s sur la surface et une fluorescence faible des spots.

On privilégiera donc une immobilisation au stade aldéhyde de la chimie CEA-2.

Réducteurs

La liaison imine entre la fonction amine de la substance fixée et la fonction aldéhyde du silane doit être réduite pour être stable dans le temps. Plusieurs produits chimiques peuvent assurer cette réduction, comme NaCNBH₃ (réduction *in situ*) ou NaBH₄ (bain de traitement post-immobilisation).

Nous avons tout d’abord essayé de mettre une certaine concentration de NaCNBH₃ dans la solution de sondes (25 mM). Ce protocole fonctionne correctement et donne de bons résultats de fluorescence (FIG. 2.15). Le schéma de spotting correspondant (série 6) est donné TAB. 2.6.

La réduction par NaBH₄, utilisée dans le protocole de fixation d’oligonucléotides (puces à ADN), conduit à un bruit de fond beaucoup plus important (FIG. 2.16). NaBH₄, moins sélectif que NaCNBH₃, endommage les protéines immobilisées sur la surface, y compris celles qui limitent le bruit de fond.

- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 10% glycérol, avec NaCNBH₃
- Anticorps mAb SP31 1 μ M, 10% glycérol, sans NaCNBH₃
- Anticorps biotinylé mAb SP31-biot 0,8 μ M, 10% glycérol, avec NaCNBH₃
- Anticorps biotinylé mAb SP31-biot 0,8 μ M, 10% glycérol, sans NaCNBH₃
- Anticorps témoin Il2-73 1 μ M, 10% glycérol, avec NaCNBH₃
- Anticorps témoin Il2-73 1 μ M, 10% glycérol, sans NaCNBH₃
- Peptide LMN1 1 μ M, 10% glycérol, avec NaCNBH₃
- Peptide LMN1 1 μ M, 10% glycérol, sans NaCNBH₃

TAB. 2.6 – Schéma de spotting de la série 6

Enfin, nous avons testé l’utilisation du NaCNBH₃ en bain de traitement post-immobilisation (FIG. 2.18), plutôt que directement dans la solution de sondes. Comme ce test a été réalisé plus récemment, le protocole a évolué. Il faut donc comparer ce résultat à un test identique sans bain de NaCNBH₃ (FIG. 2.17, série 28, TAB. 2.7).

Sans bain de NaCNBH₃, les spots d’anticorps spécifiques sans NaCNBH₃ en solution sont peu fluorescents et moins nets (FIG. 2.17, lignes 4-5). Les mêmes spots après bain de NaCNBH₃ montrent une bonne fluorescence, mais également d’importantes traînées (FIG. 2.18, lignes 4-5).

On choisira donc de réduire la fonction imine in situ avec NaCNBH₃ en solution à 25 mM.

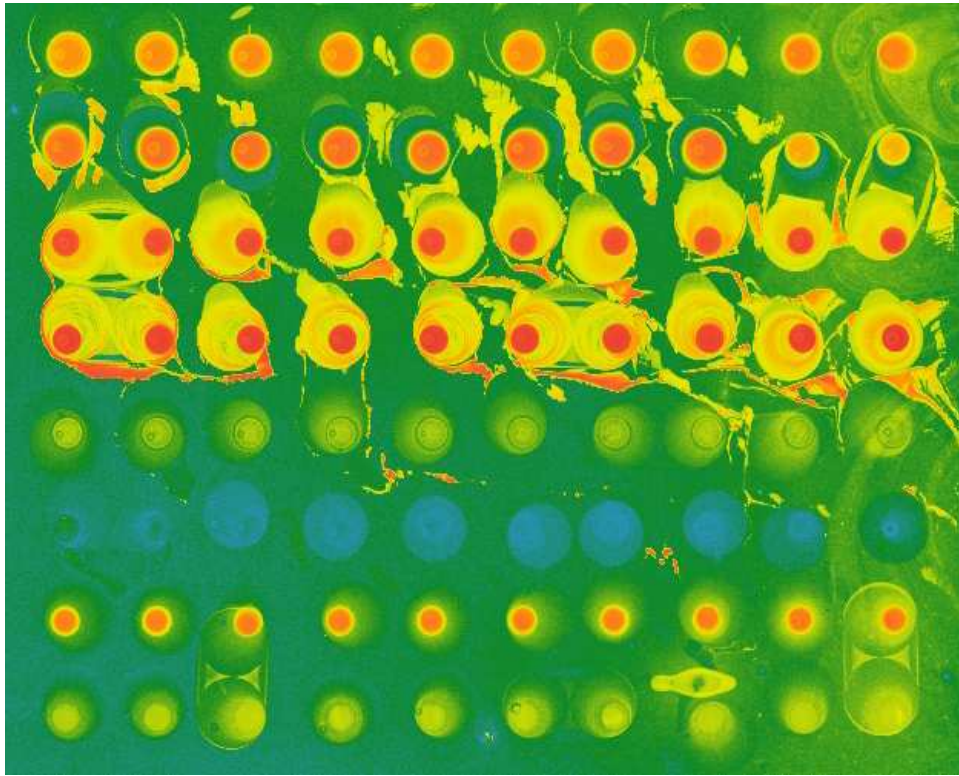


FIG. 2.15 – Essai de différents réducteurs : sans bain NaBH_4 . Série 6, lame 217b-06. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4°C . Rinçage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation avec des peptides biotinylés LMN1, pré-réagés à la streptavidine-Cy3, à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à 37°C . Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, (450,10).

- Anticorps mAb SP31 1 μM , 10% glycérol, avec NaCNBH_3
- Anticorps mAb SP31 1 μM , 10% glycérol, avec NaCNBH_3
- Anticorps témoin Il2-73 1 μM , 10% glycérol, avec NaCNBH_3
- Anticorps mAb SP31 1 μM , 10% glycérol, sans NaCNBH_3
- Anticorps mAb SP31 1 μM , 10% glycérol, sans NaCNBH_3
- Anticorps témoin Il2-73 1 μM , 10% glycérol, sans NaCNBH_3

TAB. 2.7 – Schéma de spotting de la série 28

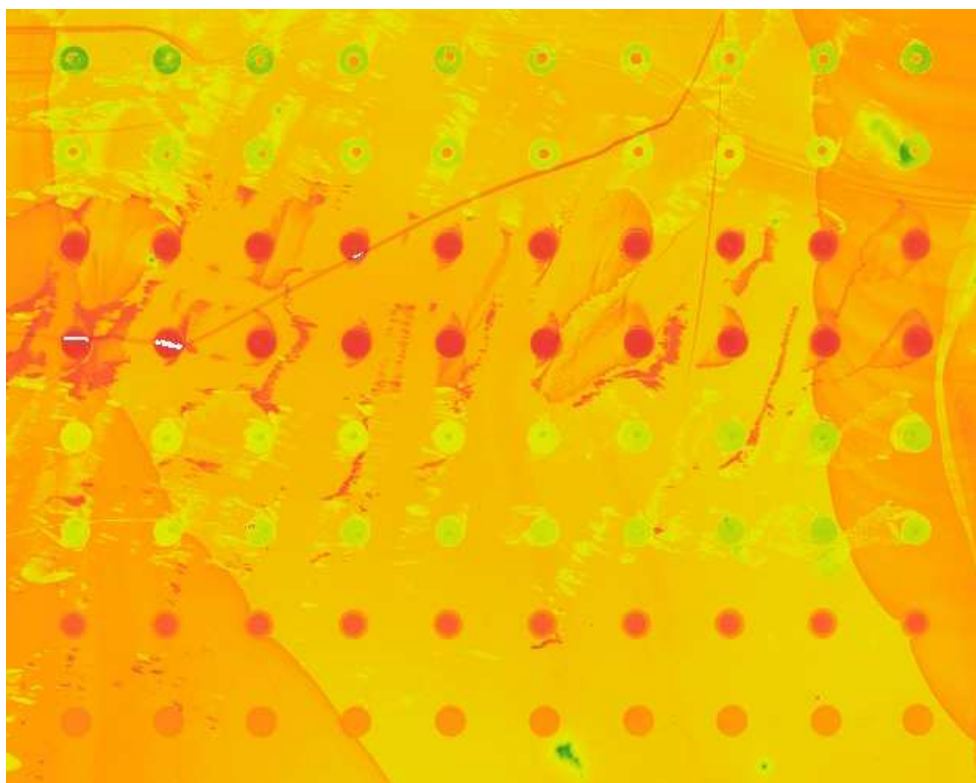


FIG. 2.16 – Essai de différents réducteurs : avec bain NaBH_4 . Série 6, lame 217b-07. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4°C . Rincage et saturation à la BSA (tampon EIA-3). Séchage à la soufflette. Incubation avec des peptides biotinylés LMN1, pré-révéls à la streptavidine-Cy3, à 500 nM en tampon EIA-3, 2h à 37°C . Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, (450,10).

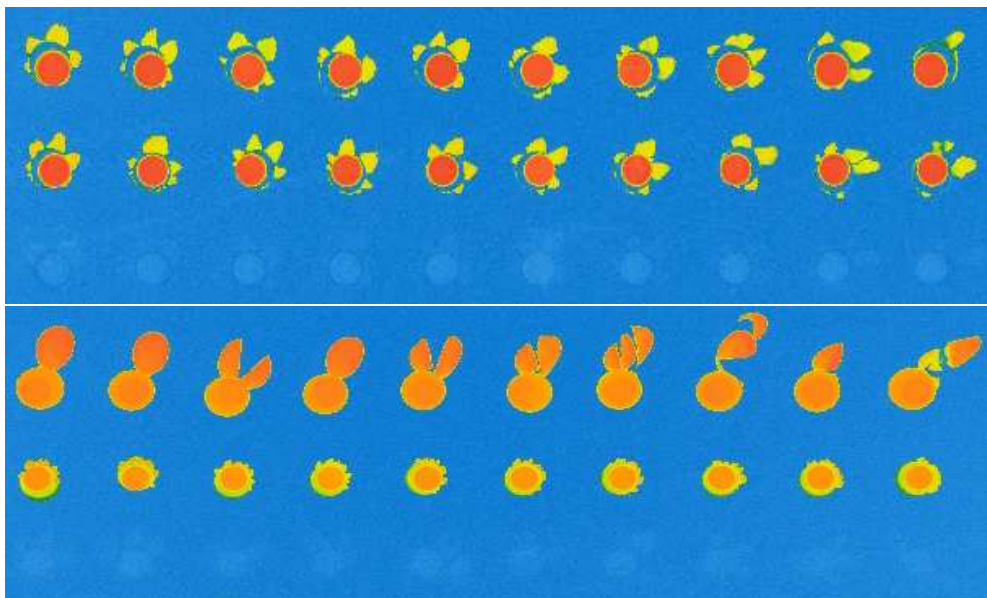


FIG. 2.17 – Essai de différents réducteurs : sans bain NaCNBH_3 . Série 28, lame 236-29. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 2%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation au régilait (tampon PBS - régilait). Séchage à la soufflette. Incubation avec des peptides LMN1, marqués à l'Alexa-532, à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, (450,10).

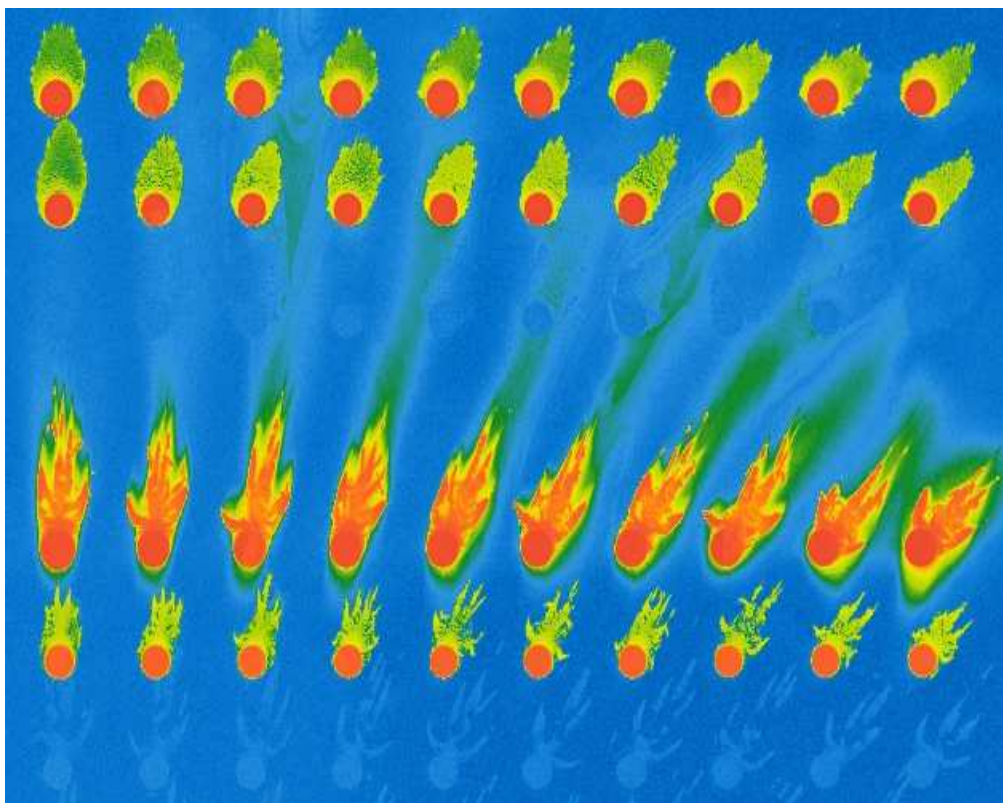


FIG. 2.18 – Essai de différents réducteurs : avec bain NaCNBH_3 . Série 28, lame 236-31. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 2%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation au régilait (tampon EIA-2 régilait). Séchage à la soufflette. Incubation avec des peptides LMN1, marqués à l'Alexa-532, à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, (450,10).

2.2.5 Conclusion : Protocole optimisé

Protocole optimisé

Les expériences réalisées au cours de cette étude, notamment en collaboration avec Isabelle MIN-GAM, ont permis de rédiger un protocole optimisé pour le greffage d'anticorps et de peptides sur la chimie CEA-2. Ces recommandations n'ont cependant été testées que sur notre modèle immunologique particulier.

Les sondes (anticorps ou antigènes) sont immobilisées au stade aldéhyde de la chimie CEA-2. Elles sont préparées dans un tampon Na_2HPO_4 0,03 M, NaCNBH_3 0,025 M, avec 2% de glycérol pour des anticorps, et 10% pour des peptides.

L'immobilisation a lieu pendant une nuit à quatre degrés en chambre humide (tube falcon). La lame est lavée au PBS - Tween 0,1% en bain de quelques secondes, puis immergée dans le tampon de blocage EIA2-régilait (PhK 0,1 M, NaCl 0,15 M, NaN_3 0,01% (w/v), régilait 0,1 %) ou PBS - régilait 0,1 % pendant au moins deux heures à 37°C.

Juste avant l'incubation, la lame est séchée doucement à la soufflette d'azote. Les cibles sont déposées sous forme d'une goutte de 7 μL sur les spots, aussitôt étalée sous un quart de lamelle Hybrislip. L'incubation dure une heure à 20°C.

La lame est ensuite lavée au PBS - Tween 0,1% en bain, puis séchée à la centrifugeuse (600 tr/mn, 5 mm). La lecture de fluorescence est habituellement faite avec un gain de 450 et une puissance laser de 10% sur le scanner Axon Genepix 4000B.

Test de reproductibilité

Ce protocole optimisé a été appliqué afin d'estimer la reproductibilité de notre test biologique. Nous avons pour cela réalisé un spotting sur l'ensemble de la lame de verre (couverture d'environ 80%). Nous avons déposé 2196 spots (36 colonnes \times 61 lignes; pas en X : 600 μm ; pas en Y : 800 μm) d'anticorps mAb SP31, incubés avec des peptides LMN1 marqués à l'Alexa-532.

Le critère de variation interspots, qui est un indicateur de la reproductibilité entre plusieurs spots représentant le même test, est de 7,7% pour ce test (calcul effectué sur un échantillon de 1500 spots de la zone incubée), ce qui représente une valeur correcte.

Les spots sont nets, homogènes et fortement fluorescents.

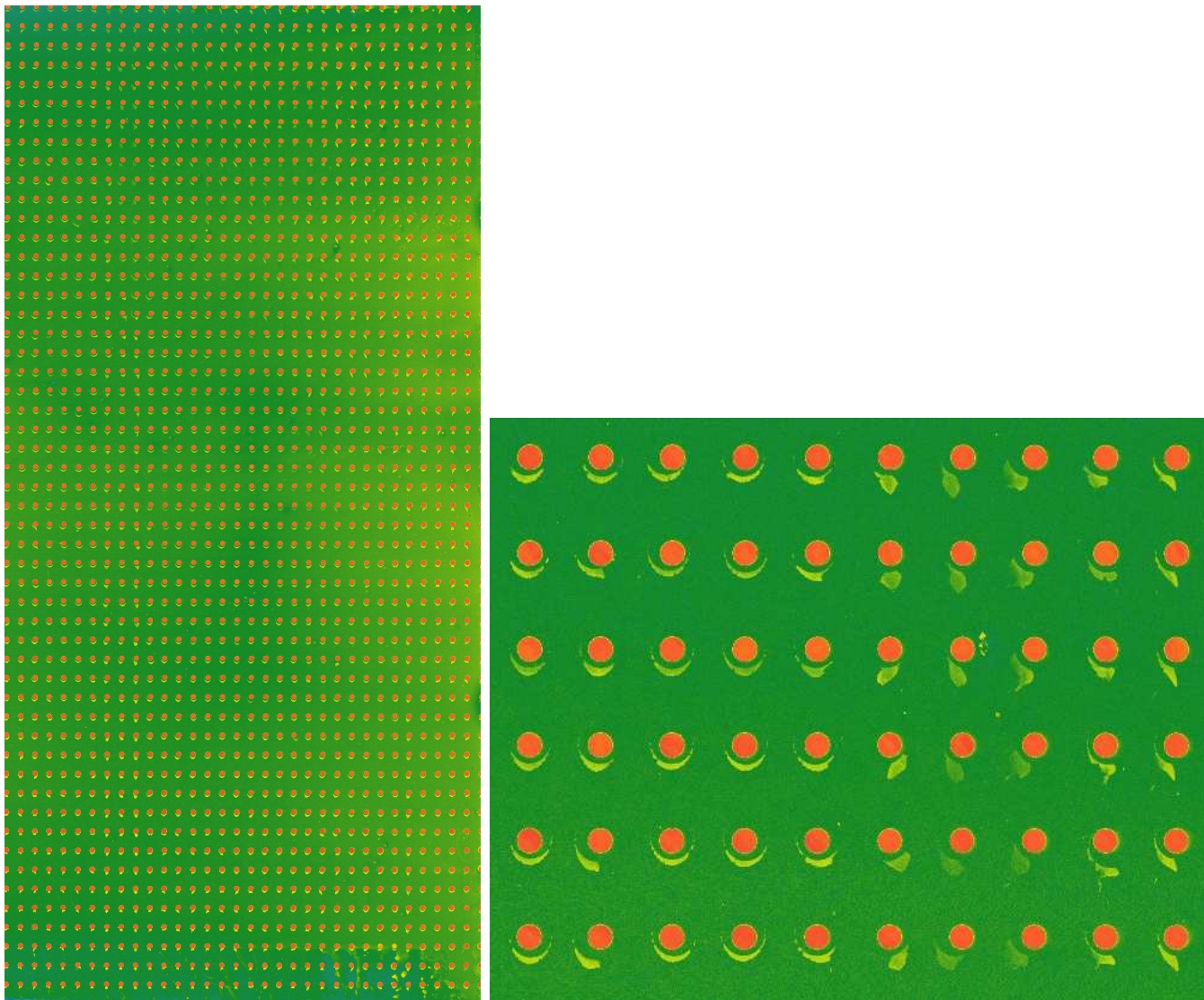


FIG. 2.19 – Reproductibilité du test biologique. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween (bain), saturation en EIA2 - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

2.3 Cinétique de la réaction anticorps – antigène

Des expériences de lecture de fluorescence en continu ont été réalisées en collaboration avec Rémi GALLAND du Laboratoire d’Imagerie des Systèmes d’Acquisition (Léti / DTBS / STD / LISA). Elles nous ont permis d’étudier la cinétique de la réaction anticorps – antigène de notre modèle. Cependant, nous ne disposons que d’un temps limité et nous n’avons pas pu effectuer toutes les expériences désirées.

2.3.1 Principe

On immobilise des sondes (anticorps) sur une lame de verre fonctionnalisée CEA-2 (FIG. 2.20). Grâce à un ingénieux système de cuve et de pompage, une solution contenant les cibles (peptides marqués) vient circuler sur la surface de la lame où se trouvent les sondes. Le plot est ensuite éclairé par un laser. Au fur et à mesure que les peptides viennent se fixer sur les anticorps, les fluorophores portés par les antigènes sont excités par le laser, et émettent un signal de fluorescence caractéristique. Ce signal est détecté par un photomultiplicateur puis mesuré *via* une instrumentation adaptée.

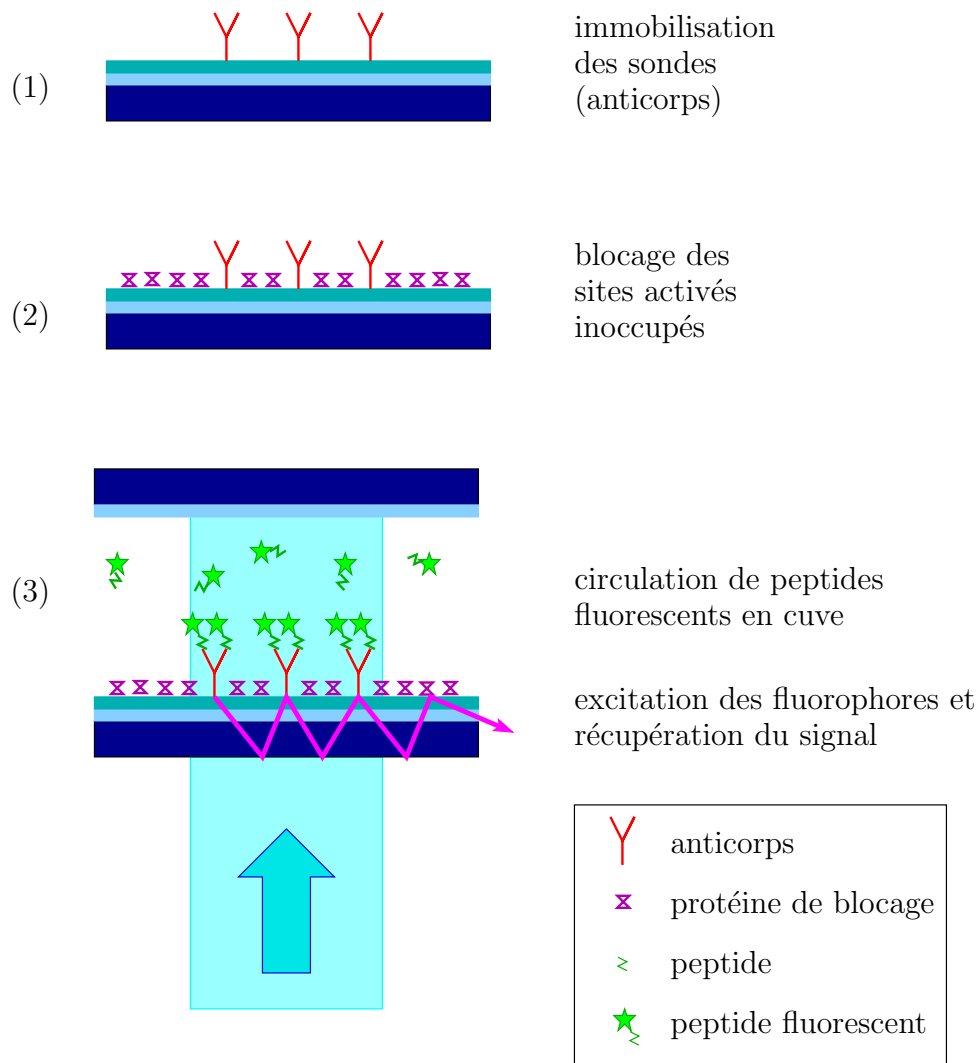


FIG. 2.20 – Principe de mesure de la cinétique de réaction anticorps – antigène

2.3.2 Protocole expérimental

Des plots de 1 mm de diamètre (environ 1 μL) de solution d'anticorps mAb SP31 sont déposés à la pipette sur une lame de verre fonctionnalisée (stade aldéhyde). La surface est ensuite saturée par immersion dans le tampon de blocage, qui sert également de tampon de conservation. La solution de cibles (LMN1-fluorescéine) est préparée dans ce même tampon.

2.3.3 Résultats obtenus

Grâce à ce montage, nous avons pu obtenir plusieurs cinétiques de réaction correspondant à des concentrations de cibles différentes : 500 nM, 100 nM et 1 nM. Les données recueillies pour les deux concentrations les plus élevées (500 nM et 100 nM) étaient peu exploitables (FIG. 2.21), et ce pour deux raisons. D'une part, la réaction s'est déroulée trop rapidement pour être détectée de façon complète. D'autre part, à cause d'un débit trop faible, on peut observer des oscillations sur les courbes. Ces artéfacts de manipulation sont le reflet des cycles de la pompe. Afin d'en faire abstraction, nous avons tracé en rouge une courbe ne tenant compte que des points supérieurs. On observe néanmoins une augmentation très rapide du signal (FIG. 2.21, 0 - 500s), avant de voir l'effet du bleaching sous forme de décroissance du signal (FIG. 2.21, 500 - 4500s)

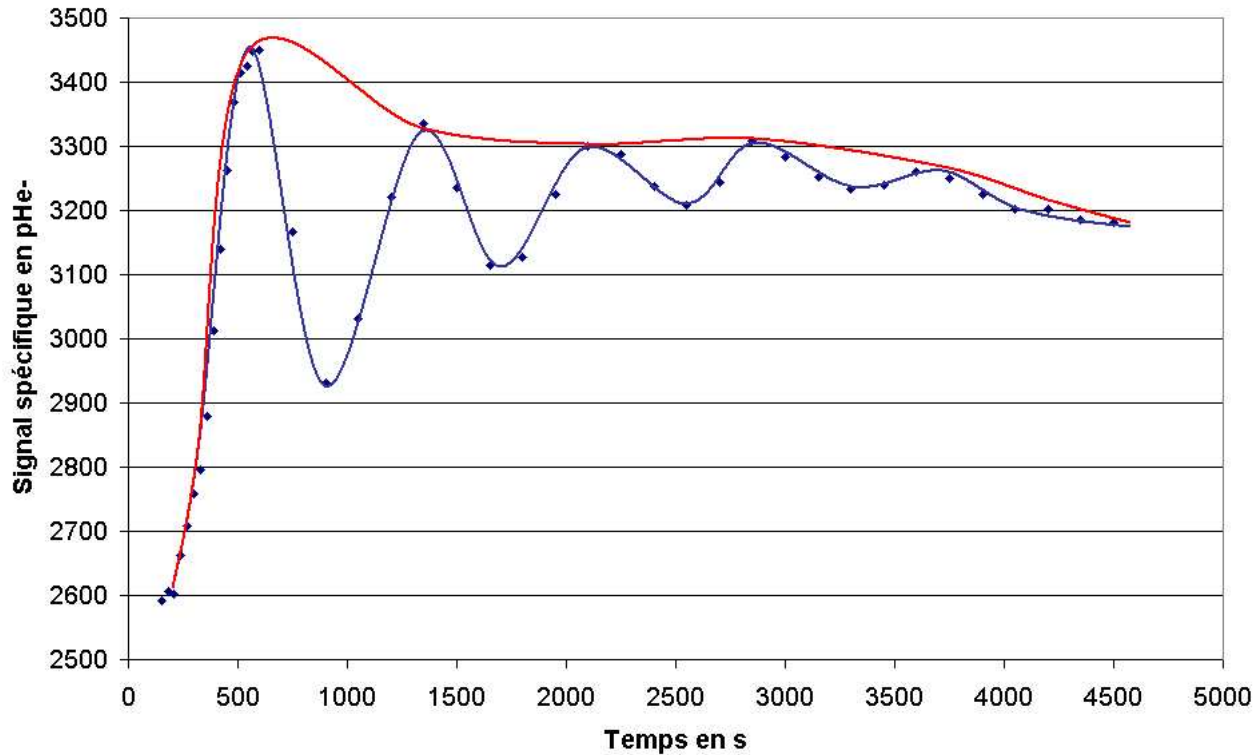


FIG. 2.21 – Cinétique de liaison anticorps – antigène. Incubation avec des peptides LMN1-fluorescéine à 500 nM, $pH = 7,4$. $P = 500 \mu\text{W}$, $D = 0,3 \text{ mL/mn}$. La courbe bleue est interprétée directement à partir des points obtenus, alors que la courbe rouge ne tient compte que des points supérieurs pour s'affranchir de l'effet des cycles de la pompe.

L'expérience avec une solution de cibles à 1 nM a été plus concluante (FIG. 2.22). Le débit a été ajusté afin de faire disparaître les oscillations observées précédemment. D'autre part, en se plaçant à 1 nM, nous avons pu observer un peu mieux le début de la cinétique (FIG. 2.22, 0 - 2000s).

Cependant, nous nous sommes aperçus que la réaction a encore été très rapide. Cela nous a amené à la conclusion qu'il était inutile d'incuber pendant deux heures, et a motivé l'expérience où nous n'avons incubé que pendant cinq minutes.

Il serait souhaitable, si ce projet d'immuno-test doit être poursuivi, d'incuber avec des concentrations plus faibles.

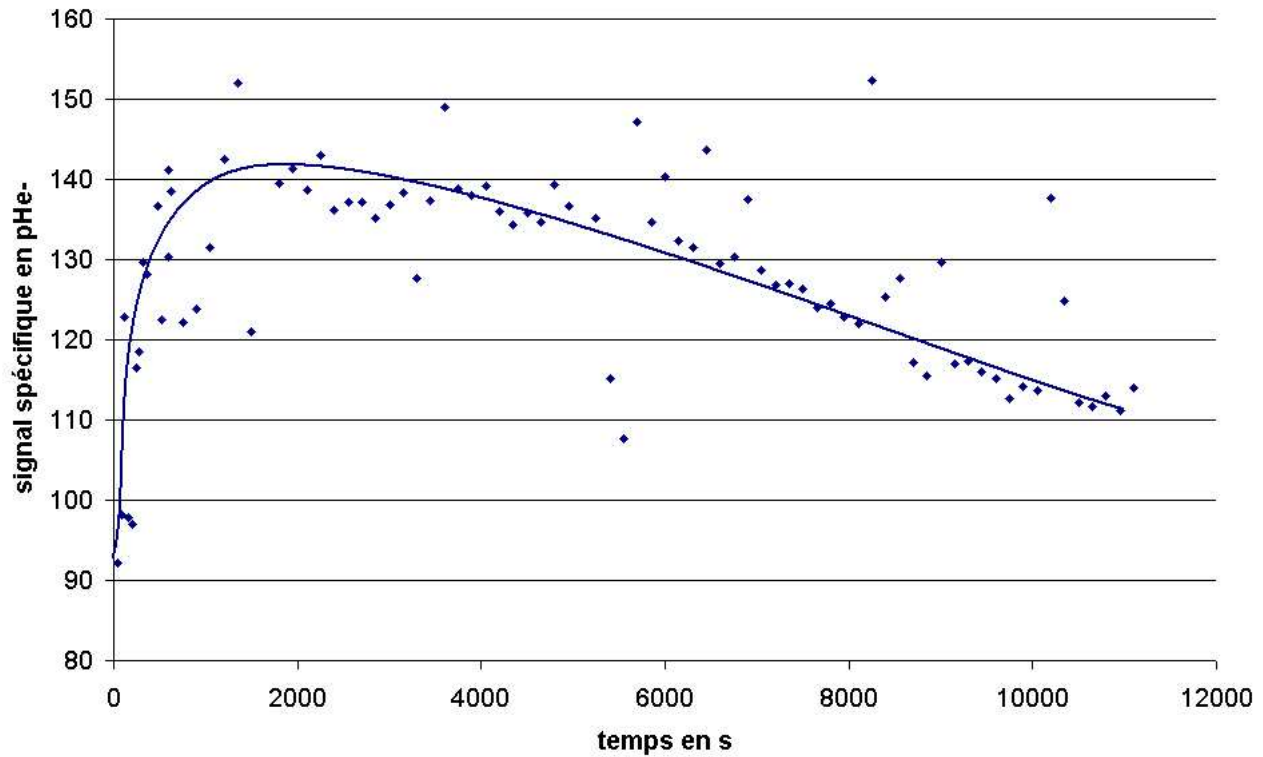


FIG. 2.22 – Cinétique de liaison anticorps – antigène. Incubation avec des peptides LMN1-fluorescéine à 1 nM, $pH = 7,4$. $P = 500 \mu W$, $D = 0,5 \text{ mL/mn}$

2.4 Lecture par Effet Mirage

2.4.1 Intérêt et principe général

Les colloïdes

Découverts au XIX^{ème} siècle par Thomas GRAHAM, les *colloïdes* sont des substances finement dispersées, formées de particules de diamètres compris entre 10 μm et 10 nm. Leurs applications à la biologie en général, et au diagnostic médical en particulier, sont très prometteuses [21].

On les utilise notamment pour détecter et quantifier la formation de couples antigène – anticorps [22].

Mesure d'interaction antigène – anticorps avec des nanobilles d'or

Dans notre étude, nous avons utilisé des nanobilles d'or de 10 nm de diamètre. Ces nanobilles étaient streptavidinées, de sorte à pouvoir s'accrocher aux biotines présentes sur nos substances biologiques. Il s'agit alors d'une lecture indirecte, comme pour le cas d'une révélation avec la streptavidine-Cy3. Ces travaux ont été réalisés avec Violaine VIZCAINO, stagiaire au Laboratoire d'Ingénierie des Composants Photoniques (Léti / DOPT / STCO / LICP).

Le principe est le suivant : sur un substrat fonctionnalisé CEA-2, on immobilise des anticorps sous forme de spots manuels, faits à la pipette, d'environ un millimètre de diamètre (1 μL). On incube ensuite avec des antigènes biotinylés, puis on révèle avec des nanobilles d'or streptavidinées.

Lors de la lecture par effet mirage, un faisceau laser dit « pompe » amène de l'énergie à la surface du substrat sous forme de chaleur. Cette énergie est plus ou moins absorbée selon la nature de la surface, et la présence des nanobilles métalliques modifie ainsi localement l'absorption, créant un gradient d'indice de réfraction. Un second faisceau laser, le faisceau « sonde », vient ensuite tangentiellement à la surface de l'échantillon. Le gradient d'indice est mesuré *via* la déflexion du faisceau sonde sur un détecteur. Ce procédé permet ainsi une cartographie très sensible de l'échantillon.

Pour une étude plus approfondie du phénomène, on pourra se reporter à l'extrait du rapport de Violaine VIZCAINO, disponible en Annexe B.

2.4.2 Résultats

Plusieurs cartographies ont été réalisées, et nous n'en présentons ici qu'une seule. La solution d'anticorps déposée est toujours de 1 μM . L'incubation a ensuite eu lieu avec une concentration de peptides à 100 nM (FIG. 2.23). La révélation a eu lieu avec une solution de billes à 180 nM (20 μL). Le plan de dépôt (spotting manuel) est donné TAB. 2.8.

- ○ Anticorps mAb SP31 1 μM , 2% glycérol
- ○ Anticorps mAb SP31 1 μM , 2% glycérol
- ○ Anticorps témoin Il2-73 1 μM , 2% glycérol

TAB. 2.8 – Effet Mirage : schéma de spotting manuel

On observe clairement les différents spots d'anticorps spécifiques (FIG. 2.23, lignes 1 et 2), ce qui signifie que les antigènes s'y sont correctement accrochés. Les spots d'anticorps témoin (FIG. 2.23, ligne 3) ne peuvent pas être distingués du bruit de fond. Cependant, les concentrations de cibles utilisées sont loin de constituer l'état de l'art dans le domaine, et des expériences plus poussées méritent d'être entreprises afin d'améliorer la sensibilité du dispositif.

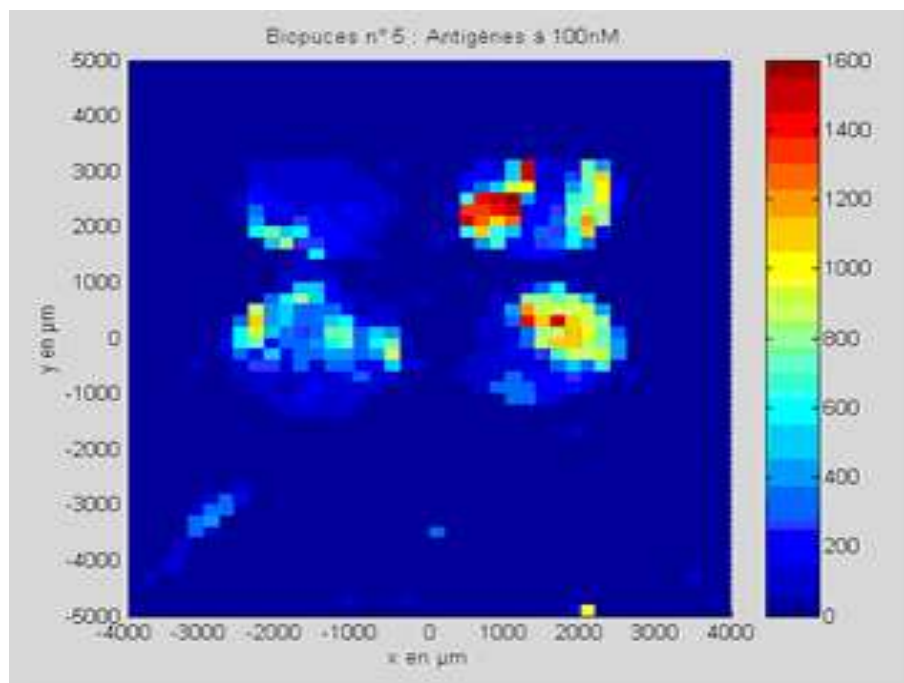


FIG. 2.23 – Solution de cibles à 100 nM. Immobilisation : stade aldéhyde, glycérol 10%, une nuit à 4°C. Rinçage et saturation au régilait (tampon EIA-2 régilait). Séchage à la soufflette. Incubation avec des peptides biotinylés LMN1, à 200 nM en tampon EIA-2 régilait, 2h à RT. Séchage à la soufflette. Révélation avec les nanobilles d'or streptavidinées, à 180 nM en tampon PBS, 2h à RT. Séchage à la soufflette. Lecture par effet mirage.

2.5 Caractérisation par Réflectivité de neutrons

Grâce à un partenariat avec l'Institut Laue-Langevin (ILL), nous avons eu l'opportunité de caractériser nos surfaces et interfaces biologiques par réflectivité de neutrons. Cette étude a été menée en collaboration avec Giovanna FRAGNETO. Le rapport complet d'expériences n'ayant pas encore été rédigé, nous ne donnons ici que les principaux résultats.

2.5.1 Principe général

Le réflectomètre D17 à l'ILL

Achevé en 2000, le réflectomètre D17 de l'ILL (FIG. 2.24) est un outil dédié à l'étude des surfaces et des interfaces, en particulier dans le domaine de la biologie et de la chimie [23].

Les expériences de caractérisation par réflectivité de neutrons permettent notamment de déterminer l'épaisseur d'une couche et sa rugosité. Par ailleurs, il est possible, en deutérant certaines solutions, de modifier le contraste et donc d'obtenir plus d'informations.

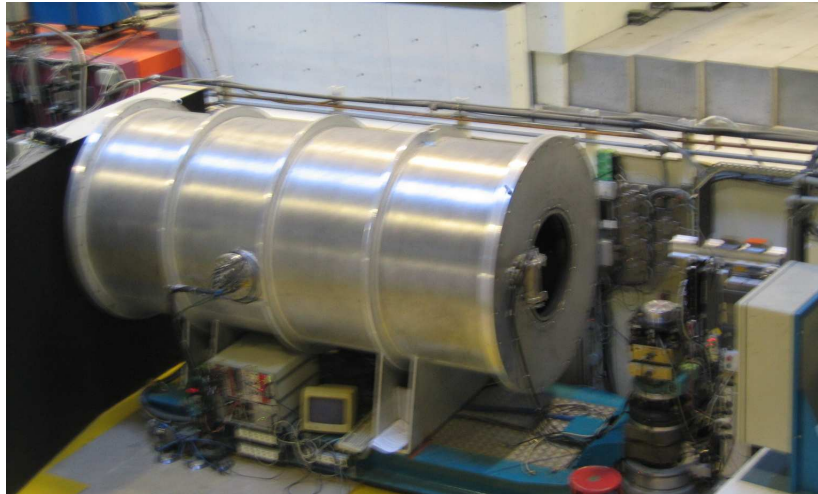


FIG. 2.24 – Réflectomètre D17 de l'ILL

Caractérisation d'interfaces biologiques par réflectivité de neutrons

Nous avons réalisé le greffage d'antigènes sur des substrats épais de SiO_2 , utilisés pour les besoins de la mesure. Lors de cette étude, nous avons immobilisé des antigènes et incubé avec des anticorps, de sorte que le contraste entre les différentes étapes soit plus important. Les mesures ont concerné les différentes étapes du protocole : chimie sans substances biologiques, immobilisation d'antigènes, blocage à la BSA, incubation avec l'anticorps spécifique et l'anticorps témoin.

Deux échantillons de silicium ont été étudiés. Ils ont subi les mêmes traitements jusqu'à l'incubation avec les anticorps, où l'un a été incubé avec l'anticorps spécifique mAb SP31, et l'autre avec l'anticorps témoin Il2-73.

2.5.2 Résultats

Le SMW est de l'eau avec une SLD de $2,07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. L'unité d'épaisseur et de rugosité est le nanomètre. L'unité de SLD est 10^{-6} \AA^{-2} .

L'épaisseur et la SLD des couches d'oxyde ($e = 1,3$ nm, $sld = 3,41 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) et de silane ($e = 0,7$ nm, $sld = -0,4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) semblent correctes (TAB. 2.9). Lorsque l'on immobilise l'antigène sur la couche de silane (TAB. 2.10), il apparaît une nouvelle couche, de 6,7 nm d'épaisseur et dont la SLD est compatible avec celle d'une couche de peptides ($1,41 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$).

Ensuite vient la saturation à la BSA (TAB. 2.11). La présence de la BSA ne change pas l'épaisseur de la couche biologique, mais la rend plus dense ($sld = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) : il est probable que les protéines de BSA viennent occuper les sites laissés vacants par les antigènes. Cependant, il faudrait deutérer l'une des deux espèces pour déterminer s'il s'agit bien d'une couche mixte.

Les résultats obtenus pour l'échantillon incubé avec l'anticorps spécifique sont assez inattendus (TAB. 2.12) : en effet, l'épaisseur de la couche est inférieure de 9 Å à celle de la couche précédente, alors que l'on s'attendait à une couche plus épaisse (fixation des anticorps sur les antigènes).

D'autre part, l'échantillon incubé avec l'anticorps témoin présente les mêmes résultats (TAB. 2.13). Nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses pour expliquer ce phénomène. Notamment, les substances biologiques que nous utilisons sont particulièrement sensibles à leur environnement, et sont d'habitude toujours conservées en tampon phosphate (avec quelques variations). Il est possible que les liquides utilisés pour observer des contrastes différents (D_2O , SMW) aient endommagé nos sondes et nos cibles.

Dans le cadre d'une éventuelle prochaine série d'expériences, il serait conseillé d'utiliser ces liquides pour préparer du tampon phosphate, de façon à conserver un contraste intéressant mais également un environnement physiologique adapté aux substances biologiques.

Conclusion

Nous avons démontré la faisabilité d'un immuno-test sur un substrat plan fonctionnalisé par la chimie CEA-2.

Dans un premier temps, cette étude nous a permis de mettre au point les conditions optimales de ce test. Ces résultats vont nous permettre d'évaluer la sensibilité de ce test biologique. Si ces résultats s'avèrent intéressants (comparaison à l'état de l'art), le transfert de ce protocole dans des microsystèmes de diagnostic pourrait être envisagé.

Dans ce cadre, nous avons également souhaité travailler sur le protocole de silanisation CEA-2, afin qu'il puisse s'adapter le plus facilement possible aux microsystèmes. Nous avons choisi d'explorer la voie en phase gazeuse qui, en évitant l'emploi de solvants organiques, limite les problèmes de compatibilité avec les matériaux utilisés dans les microsystèmes.

Il faudra néanmoins vérifier que d'autres modèles immunologiques fonctionnent sur la chimie CEA-2. On ne peut en effet se contenter d'un unique test. Pour des applications telles que le diagnostic médical, la chimie de greffage se doit d'être compatible avec le plus grand nombre possible de substances biologiques à immobiliser. Contrairement aux oligonucléotides utilisés pour les puces à ADN, les propriétés de chaque protéine sont très différentes : charge électrique, hydrophilie / hydrophobie, etc., et il est donc d'autant plus difficile de trouver une chimie polyvalente.

D'autre part, les expériences de lecture en continu et lecture par effet mirage sont prometteuses. Nous avons démontré la faisabilité de ces expériences, mais nous sommes loin d'en avoir tiré toutes les possibilités. Il s'agit maintenant de réaliser des expériences plus poussées, en améliorant par exemple la sensibilité des dispositifs de mesure (incubation avec des solutions moins concentrées).

Enfin, la caractérisation par réflectivité de neutrons est un formidable outil pour l'étude de surfaces et d'interfaces biologiques. Il serait très intéressant de procéder à de nouvelles expériences, en se basant sur les informations collectées au cours de cette étude pour améliorer le protocole et obtenir le maximum d'informations pertinentes.

couche	épaisseur	SLD	rugosité
SiO ₂	1,3	3,41	0,4
silane	0,7	-0,4	0,4

TAB. 2.9 – Caractérisation par réflectivité de neutrons d’une couche de silane CEA-2 sur substrat de silicium avec SiO₂ natif (mesures effectuées en D₂O et SMW). Données #93114-93115, #93126-93128.

couche	épaisseur	SLD	rugosité
SiO ₂	1,3	3,41	0,4
silane	0,7	-0,4	0,4
peptide LMN1	6,7	1,4	1,2

TAB. 2.10 – Caractérisation par réflectivité de neutrons d’une couche d’antigènes LMN1. Immobilisation sur silane CEA-2 sur substrat de silicium avec SiO₂ natif (mesures effectuées en H₂O (PhK) et SMW). Données #93135-93140, #93141-93146.

couche	épaisseur	SLD	rugosité
SiO ₂	1,3	3,41	0,4
silane	0,7	-0,4	0,4
peptide LMN1 + BSA	6,6	1,7	1,4

TAB. 2.11 – Caractérisation par réflectivité de neutrons d’une couche d’antigènes LMN1 avec BSA. Immobilisation sur silane CEA-2 sur substrat de silicium avec SiO₂ natif (mesures effectuées en H₂O (PhK), SMW et D₂O). Données #93147-93155, #93156-93157, #93160-93161.

couche	épaisseur	SLD	rugosité
SiO ₂	1,3	3,41	0,4
silane	0,7	-0,4	0,4
peptide LMN1 + BSA+ anticorps spéc.	5,7	1,2	1,2

TAB. 2.12 – Caractérisation par réflectivité de neutrons d’une couche d’antigènes LMN1 avec BSA et anticorps spécifique. Immobilisation sur silane CEA-2 sur substrat de silicium avec SiO₂ natif (mesures effectuées en H₂O (PhK), SMW et D₂O). Données #93147-93155, #93156-93157, #93160-93161.

couche	épaisseur	SLD	rugosité
SiO ₂	1,3	3,41	0,4
silane	0,7	-0,4	0,4
peptide LMN1 + BSA+ anticorps non spéc.	5,7	1,2	1,2

TAB. 2.13 – Caractérisation par réflectivité de neutrons d’une couche d’antigènes LMN1 avec BSA et anticorps non spécifique. Immobilisation sur silane CEA-2 sur substrat de silicium avec SiO₂ natif (mesures effectuées en H₂O (PhK), SMW et D₂O). Données #93166-93171, #93176-93178.

Chapitre 3

Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur

« The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’ (I found it!) but ‘That’s funny...’ »

Isaac Asimov

<i>Objectif : Développer un protocole de silanisation peu agressif pour les microsystemes.</i>
--

Dans le chapitre 1, nous avons présenté la chimie de greffage CEA-2, permettant la fixation de sondes biologiques sur des lames de verre. Dans cette partie, nous nous intéresserons à une étape particulière de ce protocole, la silanisation. L’un des objectifs de ce stage était de déterminer un protocole de silanisation en phase gazeuse, puis de le valider sur lame de verre afin de l’appliquer aux microsystemes.

3.1 Contexte du projet Biochiplab™

3.1.1 Les enjeux de la fonctionnalisation des microsystemes

Le développement des microsystemes dans les domaines de l’automobile, de l’aéronautique et des télécommunications est considérable [24]. Leurs promesses de miniaturisation et de réduction des coûts sont leurs principaux atouts. Pourtant, c’est dans le domaine de la biologie et de la santé que les applications sont les plus prometteuses, avec une multitude d’applications possibles : systèmes de mesure pour le diagnostic, microchirurgie, implants actifs, criblage haut débit, etc.

La fonctionnalisation de ces microsystemes est nécessaire pour réaliser l’interface avec le monde du vivant.

3.1.2 Des microsystemes intégrés dédiés à la protéomique

Qu’est-ce que la protéomique ?

La *protéomique* est l’étude à grande échelle des ensembles de protéines, de leurs fonctions et de leurs interactions [25]. Bien que ce terme ait été choisi par analogie avec la génomique, la protéomique est bien plus complexe : en effet, le génome, qui est l’ensemble du matériel génétique

d'un individu ou d'une espèce, est constant. Au contraire, le protéome, c'est à dire l'ensemble des protéines exprimées par le génome, change constamment à travers les interactions biochimiques avec le génome. L'expression des protéines change radicalement dans un organisme selon les différentes parties du corps et les différents stades de la vie.

D'autre part, le génome humain contient environ 33 000 gènes codant des protéines, alors que le protéome humain contient environ 200 000 protéines. Le recensement de toutes les protéines humaines et l'étude de leurs fonctions et interactions représente un énorme défi, et une collaboration internationale a été mise en place, coordonnée par la Human Proteome Organisation (HUPO, www.hupo.org).

La synthèse des protéines

La synthèse des protéines à partir de l'ADN se fait en deux étapes : la *transcription* et la *traduction*. Au cours de la transcription (FIG. 3.1), l'ARN polymérase permet d'obtenir, à partir de l'ADN, un ARN messenger. Celui-ci est ensuite « lu » par un ribosome lors de la traduction (FIG. 3.2), ce qui permet d'obtenir les chaînes d'acides aminés formant les protéines.

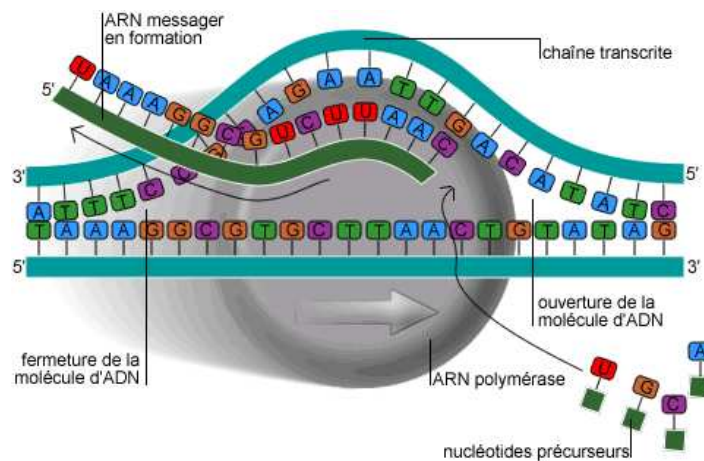


FIG. 3.1 – Transcription de l'ADN en ARN messager (G.BOKIAU, [25])

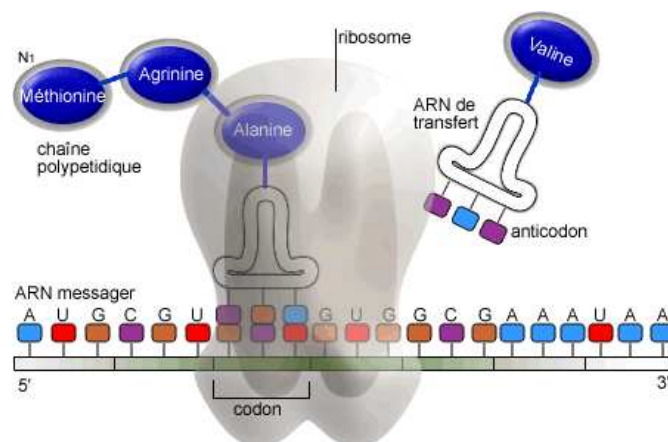


FIG. 3.2 – Traduction de l'ARN messager en protéines par les ribosomes (G. BOKIAU, [25])

3.1.3 Principe et caractérisation de la digestion peptidique

Digestion peptidique des protéines

Afin de les étudier, les protéines sont fragmentées par l'action d'une enzyme spécifique, la *trypsine* (FIG. 3.3), réalisant ainsi l'opération inverse de la traduction. La trypsine est une enzyme du suc pancréatique que l'on fixe sur le support par couplage covalent.

Ces peptides sont ensuite analysés par spectrométrie de masse pour être identifiés.

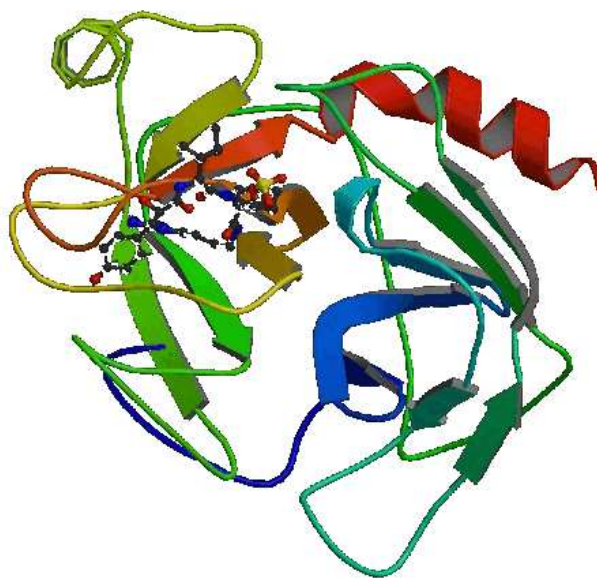


FIG. 3.3 – Trypsine avec inhibiteur aeruginosine 98-B [26, 19]

Analyse par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant de séparer des ions selon leur rapport masse / charge. Cette méthode est couramment utilisée en protéomique pour identifier des peptides provenant de protéines.

L'analyse par spectrométrie de masse des substances recueillies après digestion par la trypsine a été réalisée par Stéphanie BOUFFET du Laboratoire de Chimie des Protéines (DSV / DRDC / LCP).

3.2 Protocole de silanisation en phase vapeur

Ce travail a été réalisé en partie avec Cécile OILLIC, doctorante au LÉTI.

3.2.1 Développement d'un protocole

Étude bibliographique

Peu d'études concernant le dépôt de silane en phase vapeur sont publiées. La plupart des publications traitent de trichlorosilanes, légers et donc faciles à vaporiser. Quelques exemples ont été décrits en utilisant des triméthoxysilanes [27] mais, à notre connaissance, les triéthoxysilanes comme celui que nous utilisons dans la chimie CEA-2 n'ont pas été étudiés.

Conditions de température et de pression

À partir des travaux de SUGIMURA *et al.* [28] sur l'octadécyltrichlorosilane (OTS), et de notre protocole CEA-2 classique, nous avons été en mesure de proposer un protocole de silanisation en phase vapeur à 130°C en enceinte fermée. Dans ces conditions de température et de pression, il s'établit un équilibre liquide / gaz en silane [29].

Matériel

Nous avons utilisé une cuve en Téflon inerte vis à vis de la température et du silane, et un pillulier servant de récipient à ce silane. Il a été observé que le pillulier ne devait pas posséder de rebords : ceux-ci limitent les mouvements de convection permettant au silane de se répandre dans l'atmosphère de la cuve.

Le schéma de la silanisation est donné FIG. 3.4.

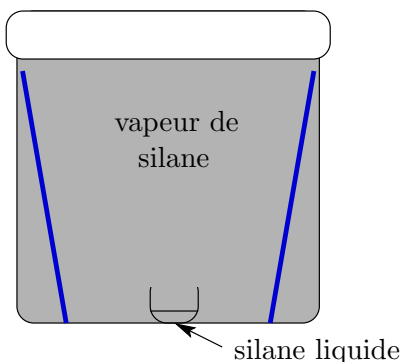


FIG. 3.4 – Schéma du dépôt en phase vapeur. Les lames de verre sont mises verticalement dans la cuve en Téflon. Le pillulier contenant le silane liquide est au centre.

3.2.2 Optimisation du protocole

Température de silanisation

Nous avons testé deux températures de silanisation : 100°C et 130°C. Les résultats de mesure d'angle de contact sont donnés au TAB. 3.1. Le principe de la mesure d'angle de contact consiste

à déposer une goutte de liquide sur la surface à caractériser et d'observer son étalement. Pour plus de détails sur cette méthode, on peut consulter l'Annexe C. On observe que les angles de contact obtenus au stade époxyde sont plus élevés à 130°C (64,8° et 71,4° pour resp. 5h et 17h de silanisation) qu'à 100°C (60,2° et 68,4°). Cependant, ces différences sont beaucoup moins marquées au niveau du stade diol (environ 47° pour 5h et 49° pour 17h).

Ce test d'une température plus faible était motivé par le fait que nous dégradions moins le silane et que nous pouvions également utiliser d'autres cuves. Par exemple, les tubes Falcon, couramment utilisés en biologie, sont étanches et censés résister jusqu'à 104°C. Jetables, leur utilisation à la place de la cuve en Téflon aurait permis une plus grande souplesse de manipulation, et aurait évité toute contamination d'une expérience à l'autre.

Pourtant, nos observations indiquent que les tubes falcon ne sont pas restés inertes pendant la silanisation à 100°C (TAB. 3.1, lignes 3 et 6). Ils ont probablement dégagé des gaz qui ont pollué l'atmosphère et la surface des lames de verre. Les angles de contact obtenus pour ces substrats sont par conséquent grandement sujets à caution.

contenant	durée	température	époxyde	diol
cuve Téflon	5h	130°C	64,8	47,5
cuve Téflon	5h	100°C	60,2	47,3
tube Falcon	5h	100°C	64,3	54,1
cuve Téflon	17h	130°C	71,4	49,2
cuve Téflon	17h	100°C	68,4	49,4
tube Falcon	17h	100°C	76,5	68,1

TAB. 3.1 – Mesure d'angle de contact (en degrés) sur le lot 238

Nous continuerons donc à effectuer la silanisation pendant trois heures à 130°C en cuve Téflon.

Durée de silanisation

Les résultats du lot 238 (TAB. 3.1) nous ont également permis de tirer des conclusions quant à la durée de silanisation. La durée « habituelle » est de trois heures. Nous avons testé cinq heures et dix-sept heures de silanisation. Les mesures d'angle de contact, qui donnent des résultats proches (47,5° contre 47,3° au niveau du diol pour resp. 5h et 17h de silanisation), indiquent que cinq heures suffisent pour atteindre la saturation de la surface en silane. Les autres tests effectués sur des silanisations de trois heures (cf. 3.2.4) permettent de penser que trois heures suffisent.

Différentes activations

Différentes activations de surface ont été testées afin d'observer leur influence sur la silanisation. Nous avons comparé les angles de contact des différents substrats aux stades époxyde et diol (TAB. 3.2).

L'angle obtenu au stade époxyde est sensiblement le même quelle que soit l'activation (TAB. 3.2, colonne 2), et voisin de 70°, mais sans activation l'angle est un peu plus faible (65°). Les angles obtenus au stade diol sont corrects, bien qu'un peu faibles car compris entre 40° et 45° (TAB. 3.2, colonne 3).

L'activation reste donc au choix, en fonction du substrat à silaniser.

activation	époxyde	diol
pas d'activation	65,0	46,6
NaOH Brown 3,3N et HCl	70,3	43,3
NaOH Brown 1,7N US	71,5	40,8
NaOH Brown 0,1N US	71,5	44,3
Plasma O ₂	71,7	42,8

TAB. 3.2 – Angles de contact (en degrés) obtenus pour différentes activations. Série 245 : Silanisation à 130°C pendant 19 heures.

3.2.3 Caractérisation des couches de silane par AFM

Afin de déterminer l'homogénéité et la rugosité des couches de silane déposées en phase vapeur, nous avons mené une étude par microscopie à force atomique (AFM). Pour cela, nous avons silanisé des substrats de 1×1 cm de silicium avec oxyde natif (5000 Å) en phase gazeuse et en phase liquide afin de les comparer.

La rugosité des échantillons silanisés en phase vapeur (FIG. 3.5) est très faible ($RMS = 2$ Å), et comparable à celle du substrat sans chimie (< 5 Å). Une couche très fine de silane a donc été déposée.

Au contraire, la silanisation en phase liquide (FIG. 3.6) conduit à une forte rugosité ($RMS = 32.02$ Å), traduisant certainement une polymérisation plus désordonnée du silane à la surface.

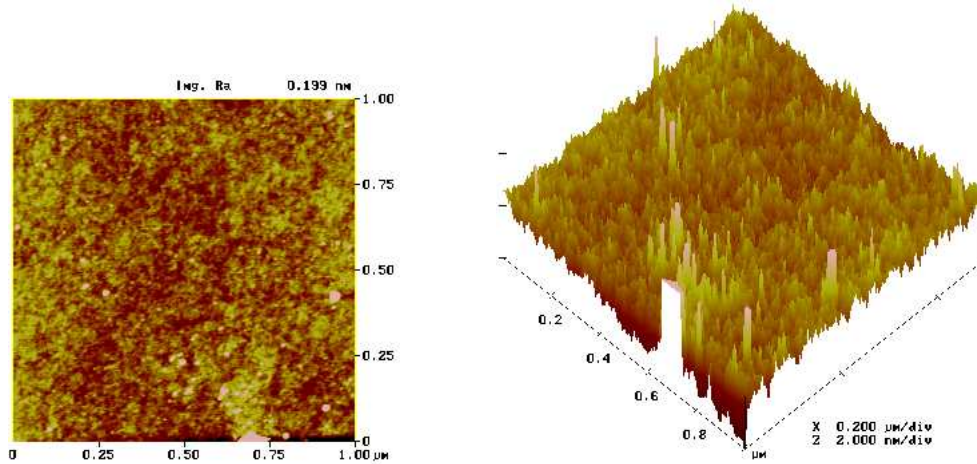


FIG. 3.5 – Échantillon 244-2. Plasma O₂, silanisation en phase vapeur, réticulation, hydrolyse acide. Rugosité : 1,99 Å.

3.2.4 Validation de la silanisation sur lame de verre

La phase de validation a été effectuée par comparaison avec la silanisation en phase liquide, pour laquelle nous possédons des données de référence. Nous avons considéré deux critères : l'angle de contact et les signaux de fluorescence.

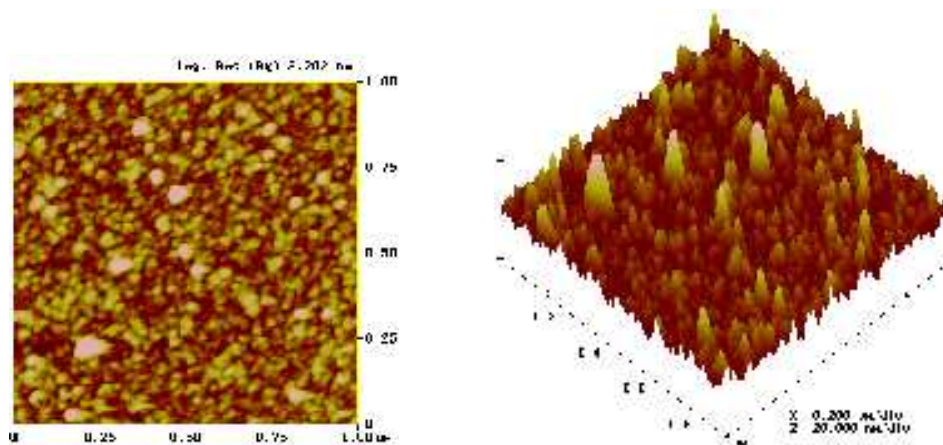


FIG. 3.6 – Échantillon 239-05 : NaOH Brown, silanisation en toluène, réticulation, hydrolyse acide. Rugosité : 32,0 Å.

Comparaison d'angles de contact

Afin de caractériser l'efficacité de la silanisation en phase gazeuse, il nous a paru judicieux de comparer les angles de contact obtenus en phase vapeur par rapport à ceux obtenus en phase liquide¹. Pour cela, nous avons effectué des relevés sur plusieurs lots silanisés en phase liquide ou en phase gazeuse (FIG. 3.7).

Les angles de référence pour la fonctionnalisation CEA-2 en phase liquide sont de 65 à 70° pour le stade époxyde et de 45 à 50° pour le diol.

On constate que les angles mesurés pour la phase vapeur ($\sim 66^\circ$ à l'époxyde et 50° au diol) sont comparables à ceux mesurés pour la phase liquide ($\sim 67^\circ$ et 54° respectivement).

Bien que cette méthode de caractérisation ne soit pas une méthode très sensible, elle permet néanmoins de conclure que nous avons déposé une couche organique de silane en phase gazeuse sur nos surfaces.

Comparaison des signaux de fluorescence

Après avoir comparé les angles de contact, nous avons souhaité comparer les signaux de fluorescence obtenus sur notre immuno-test. Nous avons réalisé de nombreux tests de greffage d'anticorps et de peptides sur des lames fonctionnalisées en phase vapeur. Nous ne présentons ici qu'un exemple simple et parlant.

Nous avons immobilisé des anticorps mAb SP31 et Il2-73 (témoins) sur une lame silanisée en phase vapeur, puis nous avons réalisé l'incubation avec des peptides LMN1 marqués à l'Alexa 532 (solution à 250 nM) (FIG. 3.8). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur la chimie CEA-2 liquide (FIG. 3.9).

Quel que soit le protocole utilisé, les lignes d'anticorps spécifiques (FIG. 3.8 et FIG. 3.9, lignes 1 et 2) montrent un fort niveau de fluorescence (phase liquide : ~ 35000 ; phase vapeur : ~ 40000), pour un bruit de fond raisonnable (resp. 520 et 660), tandis que les lignes d'anticorps témoin sont d'un niveau proche du bruit de fond.

¹La chimie CEA-2 peut être réalisée dans différents solvants : toluène, heptane, etc. La nature du solvant modifie légèrement les angles de contacts obtenus. Dans notre cas, nous avons toujours utilisé des lames de verres fonctionnalisées en CEA-2 toluène. Les angles de référence en phase liquide correspondent donc à des silanisations dans le toluène.

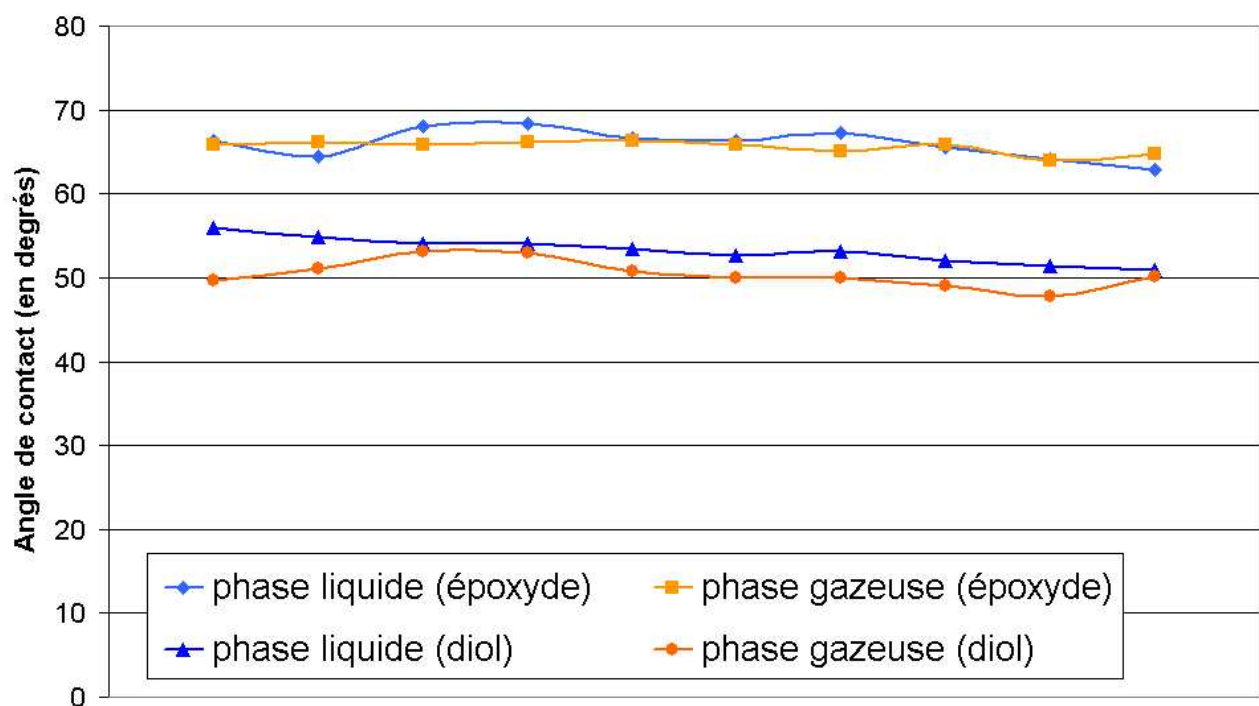


FIG. 3.7 – Comparaison entre les angles de contact mesurés (en degrés) sur plusieurs lots au cours du temps, aux deux stades époxyde et diol

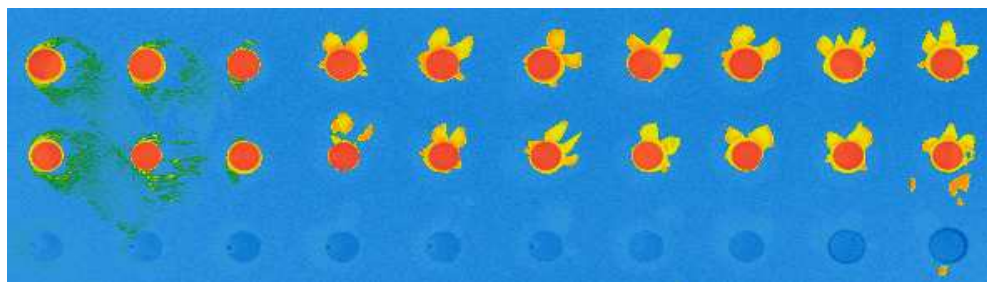


FIG. 3.8 – Immuno-test sur chimie CEA-2 vapeur. Série 28, lame 238a-02. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween, saturation en PBS - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

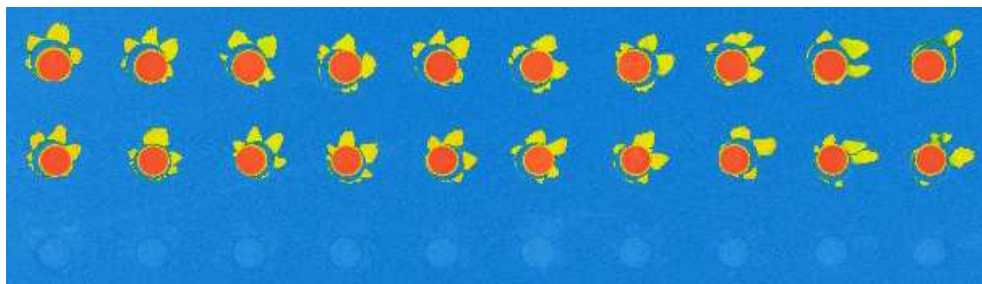


FIG. 3.9 – Immuno-test sur chimie CEA-2 liquide. Série 28, lame 236-29. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween, saturation en PBS - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

Cette expérience valide l'immuno-test sur la chimie CEA-2 en phase vapeur. Les spots spécifiques sont bien fluorescents, et les spots non spécifiques sont noyés dans un bruit de fond correct.

Homogénéité de la couche de chimie

Afin de tester l'homogénéité de la couche de chimie, nous avons effectué un spotting à grande échelle sur une surface recouvrant environ 80% de la lame. Nous avons déposé 2196 spots (36 colonnes \times 61 lignes ; pas en X : 600 μm ; pas en Y : 800 μm) d'anticorps spécifiques et incubé avec l'antigène fluorescent correspondant (FIG. 3.10).

Les spots sont nets, homogènes et bien fluorescents. Le critère de variation interspots (CV) est de 12,7% pour ce test (calcul effectué sur un échantillon de 1500 spots de la zone incubée). Ce nombre peut être comparé au CV obtenu lors du même test effectué sur la phase liquide (cf. 2.2.5), qui était de 7,7%. L'homogénéité interspots est donc plus faible pour la phase vapeur que pour la phase liquide.

Conclusion

En résumé, à partir des expériences conduites, notre protocole de silanisation fonctionne. Il consiste en une silanisation à 130°C pendant trois heures en cuve Téflon. Les caractérisations par mesure d'angle de contact indiquent des angles proches de ceux obtenus en phase liquide, quelle que soit l'activation choisie.

D'autre part, des caractérisations par AFM ont montré que la silanisation en phase vapeur permettait de garder une très faible rugosité sur la surface. Enfin, nous avons validé l'immuno-test sur des lames silanisées en phase vapeur, et vérifié de plus l'homogénéité de la chimie.

Nous pouvons donc maintenant transférer ce protocole aux microsystèmes.

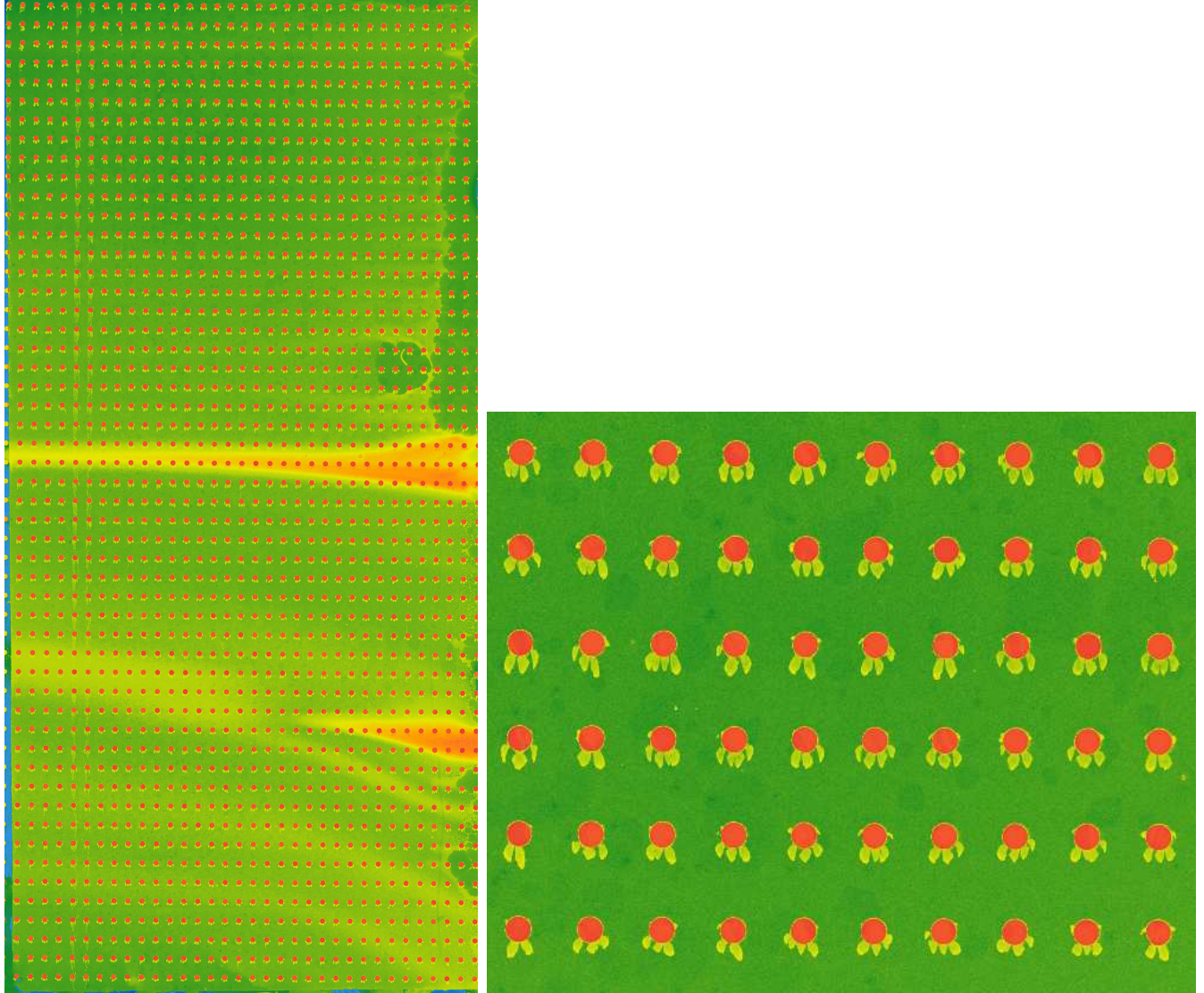


FIG. 3.10 – Homogénéité de la couche de chimie CEA-2 vapeur. Immobilisation : stade aldéhyde, une nuit à 4°C, 2% glycérol. Lavage au PBS - Tween (bain), saturation en EIA2 - régilait pendant 2h. Séchage à la soufflette. Incubation : peptides LMN1-A532 à 250 nM en PBS - régilait, 1h à RT. Séchage à la centrifugeuse. Lecture de fluorescence : $\lambda_{ex} = 532$ nm, (450,10).

3.3 Silanisation de microsystèmes Biochiplab™

Cette partie de notre étude a été menée conjointement avec Frédérique MITTLER, qui travaille sur le projet Biochiplab au LFCM.

3.3.1 Les microsystèmes Biochiplab™

L'objectif du projet Biochiplab™ est de développer un microsystème couplé à un spectromètre de masse pour des études en protéomique et pharmacologie. Une filière technologique complète en silicium est disponible, et une deuxième filière technologique associant silicium et Pyrex est en cours de validation. La dernière phase du projet consiste à intégrer un nez électrospray pour l'interface avec l'analyse par spectrométrie de masse.

Les puces Biochiplab sont constituées de plusieurs modules : micro-réacteurs, module de digestion, nez électrospray, etc. La silanisation intervient au niveau du module de digestion (FIG. 3.11). Celui-ci est fonctionnalisé par chimie CEA-2, pour pouvoir y fixer des molécules de trypsine. Notre étude a donc porté exclusivement sur le module de digestion.

La silanisation est effectuée dans la cuve en Téflon utilisée pour les lames de verre. Les puces sont déposées horizontalement au fond de la cuve. La problématique était de savoir si la vapeur de silane entrerait dans le module de digestion, large de seulement 25 μm sur certaines puces.

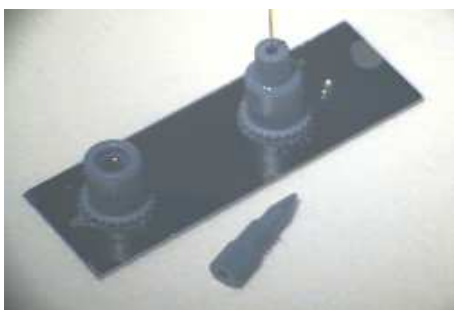


FIG. 3.11 – Module du digestion Biochiplab avec connecteurs

3.3.2 Caractérisation par fluorescence

Intérêt de la caractérisation par fluorescence

Les puces que nous utilisons sont capotées, *i.e.* recouvertes d'un capot opaque. La caractérisation de la silanisation à l'intérieur du microsystème est donc difficile : nous sommes obligés de mener le procédé jusqu'à son terme : immobilisation de la trypsine, digestion et analyse par spectrométrie de masse. Si, sur le spectre final, on distingue les pics caractéristiques des peptides constituant la protéine, cela signifie que la trypsine était présente et que la silanisation a bien eu lieu.

Ce procédé est lourd et long. Nous avons donc dû trouver un moyen plus simple et plus rapide de déterminer si la fonctionnalisation s'est correctement déroulée.

Intérêt de la caractérisation par fluorescence

Nous avons utilisé des puces avec des capots transparents. Ainsi, nous avons pu observer l'état de la chimie par fluorescence. Nous avons greffé des molécules de Cy3-phosphoramidite sur la chimie au stade diol, puis nous avons observé la puce au microscope à épifluorescence (FIG. 3.12).

Le fluorophore s'est accroché sur la couche de silane dans le réacteur. Cette couche n'est pas parfaite mais semble assez homogène sur la longueur.

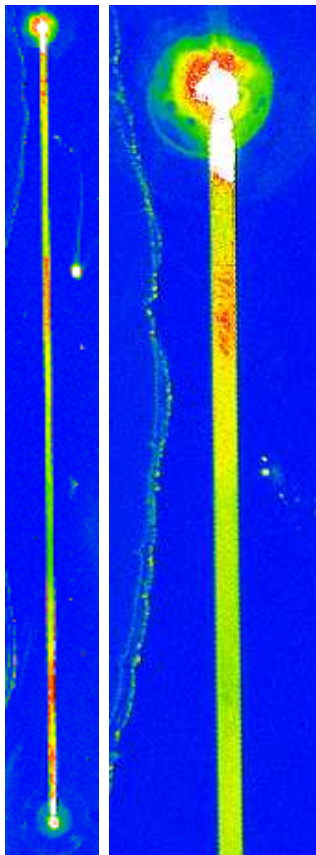


FIG. 3.12 – Caractérisation par fluorescence de la silanisation en phase vapeur d'un module de digestion Biochiplab. Fixation de Cy3-phosphoramidite sur le stade diol, 15mn. L'activation a été réalisée par plasma, puce fermée.

3.3.3 Résultats de digestion

Première expérience (Activation Brown)

La FIG. 3.13 montre le spectre de masse du résultat de la digestion du cytochrome C par la trypsine dans un module Biochiplab silanisé en phase vapeur. Il s'agit du premier essai de digestion effectué suite à une silanisation en phase vapeur. L'activation a été faite avec un Brown 3,3N.

Les carrés verts indiquent des exemples de peptides identifiés. La présence des différents pics indique que la digestion s'est correctement déroulée, même si elle peut-être pas été vraiment complète. Ce résultat encourageant nous a incité à continuer les expériences.

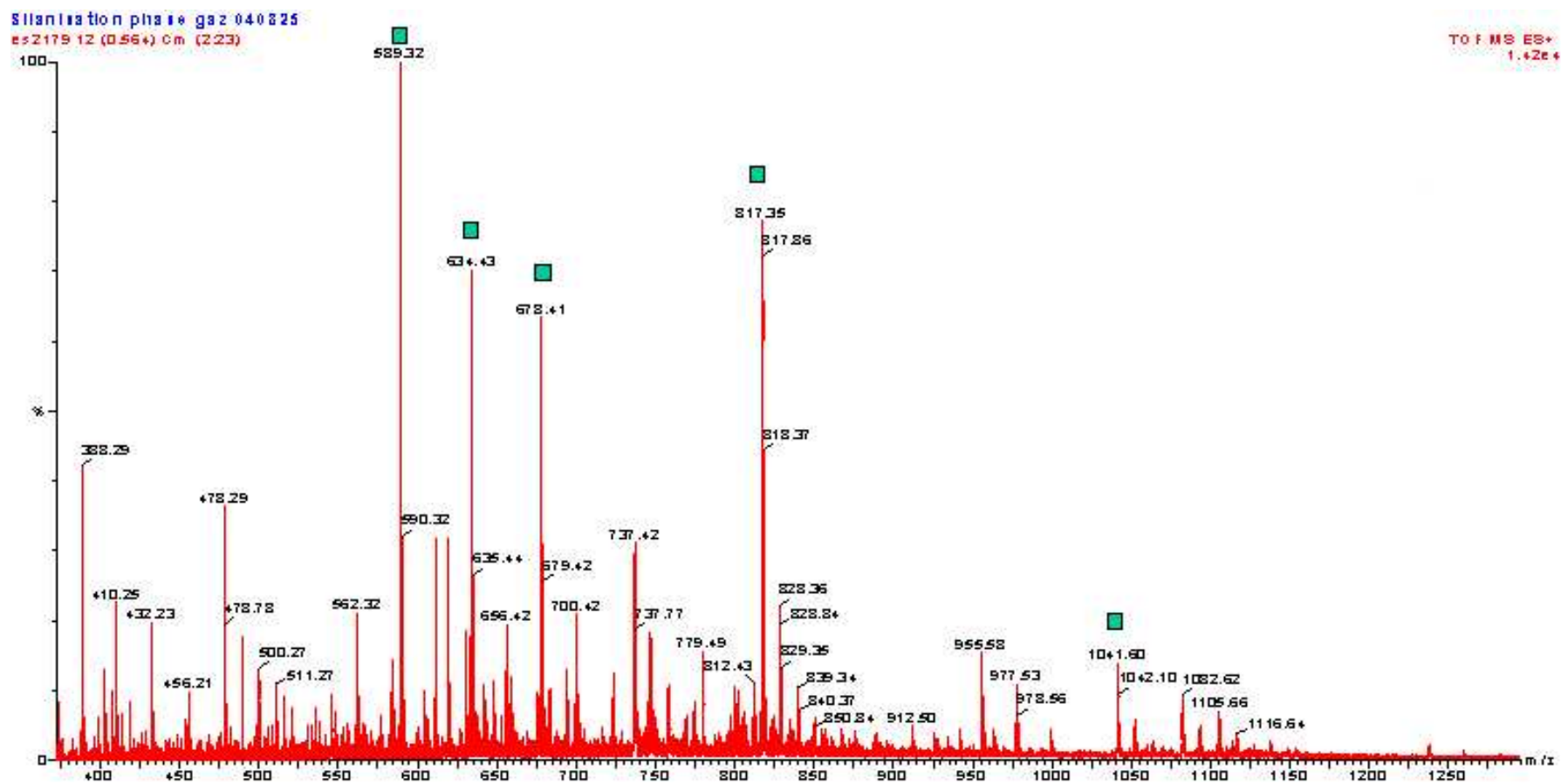


FIG. 3.13 – Digestion Cytochrome C 10 pmol/ μ L. Digestion par la trypsine immobilisée sur chimie CEA-2 avec silanisation en phase vapeur (activation Brown 3,3N). Échantillon séché au speed-vac puis repris dans ACN 50% FA0 1%.

Autres expériences

Nous avons réalisé deux autres expériences : dans l'une, nous avons testé une activation par plasma *puce fermée*, puis silanisé en phase vapeur. Dans l'autre, nous n'avons pas fait d'activation avant la silanisation. Nous avons ensuite immobilisé la trypsine, puis effectué la digestion.

Lors de cette digestion, nous avons également effectué une autre digestion sur la puce précédente, qui avait donné un bon résultat. Cette expérience nous permettait ainsi de confirmer l'accrochage covalent de la trypsine sur une couche de silane.

Conclusion

Le protocole de silanisation en phase gazeuse que nous avons proposé a été validé sur lame de verre dans le cadre de notre immuno-test. Des mesures d'angle de contact ont confirmé la présence de couches de silane. Cette validation nous a permis de passer à l'étape suivante, la silanisation de microsystèmes.

Les premiers résultats de digestion (projet Biochiplab™) sont encourageants, bien que l'on ne soit pas certain que la digestion ait été complète. C'est pourquoi nous avons effectué d'autres expériences de silanisation et de digestion. L'analyse des échantillons est en cours, et elle permettra sûrement de définir de nouvelles lignes directrices pour l'application de la silanisation en phase vapeur dans ce projet. Les expériences de greffage de fluorophores sont également très encourageantes.

D'autre part, toutes nos expériences de silanisation en phase vapeur ont été réalisées en enceinte fermée. Ce paramètre physique conditionne l'équilibre liquide / gaz lors de la vaporisation du silane. En effet, si nous pouvions diminuer la pression dans l'enceinte de silanisation, la quantité de silane présente dans l'atmosphère serait plus importante. Il serait intéressant de vérifier que cette quantité de silane gazeux est corrélée avec la qualité et la densité du dépôt de silane sur une surface. De plus, une pression plus faible permettrait de se limiter à une température inférieure à 130°C, ce qui est préférable pour le silane.

Par ailleurs, il est évident que le protocole de silanisation en phase vapeur n'est pas finalisé. Des expériences complémentaires et plus pointues, que nous n'étions pas en mesure de réaliser, sont nécessaires pour améliorer les différentes étapes et ainsi stabiliser la chimie, notamment au niveau de sa résistance aux lavages, à la température, et de sa tenue dans le temps.

Pour finir, les études de microscopie à force atomique menées au cours de ce stage ont été utiles, et permettraient sans doute de contribuer à l'optimisation du protocole. L'étude de la rugosité pourrait fournir des indications intéressantes quant à la durée de silanisation idéale.

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons montré la faisabilité d'un immuno-test sur un support plan fonctionnalisé avec la chimie de surface CEA-2. Le greffage d'anticorps et de peptides de notre modèle immunologique, basé sur la substance P, a été étudié et optimisé, ainsi que les différentes étapes d'incubation et de caractérisation par fluorescence.

Nous avons également appliqué ce modèle immunologique à différents moyens de lecture alternatifs, telle que la détection de formation de couples antigènes – anticorps par effet mirage. Nous avons également procédé à la lecture en continu de la réaction immune de notre modèle, qui mérite d'être approfondie.

Dans notre recherche du meilleur greffage possible, nous avons également travaillé à déterminer un protocole de silanisation en phase vapeur. D'après les expériences que nous avons conduites, nous avons montré que notre test immunologique fonctionne de façon équivalente sur ce nouvel aspect de la chimie CEA-2.

Nos travaux sur la fonctionnalisation en phase gazeuse ont par ailleurs permis de commencer et mener une étude sur son application à la silanisation des microsystèmes, dans le cadre du projet Biochiplab™. La silanisation en phase vapeur permettrait ainsi un traitement parallèle et simplifié des microsystèmes utilisés.

D'un point de vue plus personnel, ce stage a été l'occasion de s'immerger dans le monde de la chimie de surface, de la biochimie et des microtechnologies. Le contact de nombreux spécialistes dans des domaines très pointus mais variés m'a permis d'entrouvrir des portes vers une multitude de thèmes de recherche très intéressants.

L'atmosphère de travail était très agréable, à la fois propice au travail et suffisamment détendue pour permettre la camaraderie, et j'aimerais beaucoup avoir l'occasion de travailler de nouveau dans cette équipe.

Annexe A

Préparation des tampons biologiques

A.1 Préparation du tampon phosphate

À partir de KH_2PO_4 (acide faible) et KOH (base forte), et pour 1L de solution :

- Dissoudre 27,22g de KH_2PO_4 dans 900mL d'EDI
- Dissoudre 28g de KOH dans 100mL d'EDI pour obtenir une solution de KOH à 5M
- Utiliser la solution de KOH pour ajuster le pH de la solution de KH_2PO_4 au pH-mètre.
- Compléter avec de l'EDI pour arriver à 1L.

A.2 Préparation du tampon EIA

pour 1L de solution :

- Préparer 500mL de tampon phosphate.
- Reprendre 1g de BSA dans 10mL d'EDI et l'ajouter au tampon.
- Dissoudre 8,77g de NaCl dans 200mL d'EDI et l'ajouter au tampon.
- Dissoudre 100mg de NaN_3 dans 200mL d'EDI et l'ajouter au tampon.
- Compléter avec environ 90mL d'EDI pour arriver à 1L.

On obtient ainsi 1L de tampon EIA à PhK 0,1M, BSA 0,1%, NaCl 0,15M, NaN_3 0,01%.

Le tampon EIA-2 est le tampon EIA sans BSA.

Le tampon EIA-3 est le tampon EIA avec Tween 20 à 0,1%.

A.3 Préparation des solutions d'immobilisation

- Solution de Na_2HPO_4 à 0,2M : 284mg dans 10mL d'EDI
- Solution de NaCNBH_3 à 0,2M : 126mg dans 10mL d'EDI

Annexe B

Principe de l'Effet Mirage

*« The first principle is that you must not fool yourself.
And you are the easiest person to fool. »*

Richard P. Feynman

Ce chapitre est extrait du rapport de Violaine VIZCAINO, qui a effectué un stage ingénieur au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Composants Photoniques (Léti / DOPT / STCO / LICP) du CEA Grenoble.

Les techniques de déflexion photothermique ont été développées au début des années 80 et ont été fortement employées depuis pour caractériser l'absorption de couches minces. Le succès de cette méthode vient essentiellement du fait de sa haute sensibilité (quelques ppm). Nous allons revenir dans cette partie, sur le principe et les potentialités de cette technique et décrire les améliorations apportées au banc de mesure qui se trouve au LICP.

B.1 Étude Théorique de la Déflexion Photothermique

B.1.1 Principe général

Lorsqu'une couche mince est irradiée par un faisceau dit « pompe », une partie de l'énergie incidente est absorbée. Cette absorption provoque un échauffement du matériau, qui, par conduction thermique, chauffe le substrat. Il apparaît alors un gradient d'indice de réfraction dans les milieux entourant la couche étudiée.

Un faisceau lumineux dit « sonde » traversant ces gradients d'indice est alors dévié. Une mesure de cette déviation permet de quantifier le gradient en question, donc la température et l'absorption de la couche. L'avantage de cette méthode est de n'être sensible qu'à l'absorption de la couche et non à la diffusion. De plus, cette technique est beaucoup plus sensible (détection de pertes de l'ordre du ppm) que la spectrophotométrie.

B.1.2 Différentes configurations

Il existe trois configurations différentes de mesure de déflexion :

- la configuration colinéaire (en transmission) : le faisceau sonde traverse la couche d'air, la couche mince et le substrat, on mesure la déflexion du faisceau sonde transmis qui est sensible au gradient d'indice des trois milieux.

- la configuration en réflexion : on mesure la déflexion du faisceau sonde réfléchi qui est sensible au gradient d'indice de l'air mais également à la déformation de la surface dû à son échauffement.
- la configuration transverse dit Effet Mirage (cf FIG. B.1) : le faisceau sonde se propage dans la couche d'air parallèlement à la couche optique, il est dévié par le gradient d'indice de l'air. C'est cette configuration qui a été adoptée au LICP.

FIG. B.1 – Schéma de principe de l'Effet Mirage : mode transverse

B.2 L'Effet Mirage au LICP

B.2.1 Instrumentation

Il s'agit d'un banc de mesure (cf. FIG. B.2) par effet mirage en mode transverse destiné, initialement, à mesurer le coefficient d'extinction d'empilements réfléchissants d'épaisseur inférieure à $2\text{ }\mu\text{m}$ pour des applications de tenue au flux laser.

FIG. B.2 – Schéma de montage du banc de mesure

Nous allons décrire dans cette partie les différents éléments qui constituent ce banc de mesure.

Le faisceau pompe

Le flux incident de pompe est fourni par un laser focalisé (Argon) au niveau de la surface de l'échantillon. Cette focalisation est obtenue par des miroirs et non par un système dioptrique qui pourrait introduire des aberrations chromatiques. Il est donc possible de travailler sur une large étendue spectrale (250 nm à $1\text{ }\mu\text{m}$) sans réglages majeurs.

L'obturateur

Il s'agit d'un électro-aimant qui permet de couper le faisceau pompe. On peut choisir de le laisser ouvert tout au long de la mesure ; cependant il est parfois utile de le fermer entre deux déplacements, notamment dans le cas d'échantillons qui s'endommagent sous flux laser.

Le modulateur

Le *chopper* permet de moduler le faisceau pompe. La fréquence de modulation est choisie de sorte à augmenter le rapport signal à bruit.

Le faisceau sonde

La mesure de la déflexion de la sonde est réalisée grâce à une cellule ALIS constituée, entre autre, d'un laser He-Ne focalisé au centre de l'échantillon et d'une cellule 4 quadrants (photodiode). Le laser a une puissance de 2 mW environ et une largeur de $130\text{ }\mu\text{m}$ au point de focalisation.

Le détecteur 4 quadrants

La mesure de la déviation dans une seule direction peut se faire avec un détecteur double quadrant.

FIG. B.3 – Schéma d'un détecteur double quadrant

Le signal sur chaque diode D_1 et D_2 est proportionnel à la puissance P du faisceau incident et à l'aire A_i de l'intersection entre la diode i et le spot.

$$D_i = K P A_i \quad (\text{B.1})$$

D'où

$$D_1 - D_2 = K P (A_1 - A_2) \quad (\text{B.2})$$

Or, pour des déplacements d très faibles, $\left(\frac{d}{R_{\text{spot}}} \ll 1\right)$, la différence des surfaces $A_1 - A_2$ est proportionnelle à d . On en déduit que la différence des signaux délivrés par les deux photodiodes varie de façon linéaire avec le déplacement d :

$$D_1 - D_2 = K' P d \quad (\text{B.3})$$

On peut généraliser ce raisonnement à une photodiode 4 quadrants, et à la mesure d'une déviation dans deux directions orthogonales, comme pour la cellule ALIS.

La détection synchrone

Les différences horizontales et verticales du détecteur sont envoyées sur les détections synchrones, qui enregistrent les variations de la sonde à la fréquence de modulation de la pompe.

L'avantage de ce mode de détection est de permettre de s'affranchir du bruit généré par la mesure, en effectuant un filtrage passe bas du produit de notre signal de référence envoyé au chopper et du signal de mesure issu de la déviation du faisceau.

Les platines de translation

Les positionnements relatifs faisceau sonde / faisceau pompe / échantillon se font par l'intermédiaire de 5 moteurs de translation représentés sur la FIG. B.4.

- La platine (1) permet de traduire selon y le miroir de focalisation du faisceau pompe, afin de trouver la position pour laquelle les faisceaux sonde et pompe coïncident, c'est-à-dire que la hauteur y entre le point d'impact et le point de mesure soit nulle. En effet, si le faisceau sonde est déplacé d'une distance y par rapport au point d'impact du laser pompe, on ne mesure plus la quantité de chaleur Q créée au point d'impact mais uniquement la part de Q qui a diffusé thermiquement à la distance y .

- La platine (2) permet de translater selon z le miroir de focalisation afin que le waist du faisceau pompe se trouve au niveau du faisceau sonde.
- La platine (3) permet de positionner l'échantillon par rapport au faisceau sonde.
- Les platines (4) et (5) permettent entre autre de réaliser des cartographies d'absorption en déplaçant l'échantillon par rapport à l'ensemble pompe-sonde.

FIG. B.4 – Coupe selon le plan zOy du dispositif de positionnement relatif des trois éléments Pompe / Sonde / Échantillon.

B.2.2 Détermination de l'absorption d'un échantillon

Une mesure relative

Pour de faibles absorptions, l'amplitude de déviation est une fonction linéaire de l'absorption. On ne procède donc pas à des mesures absolues, mais à des mesures relatives à celle d'un échantillon de pertes connues ; on effectue ainsi un étalonnage du banc.

On détermine une constante d'étalonnage :

$$C = A_e \frac{P_e}{DH_e} \quad (\text{B.4})$$

où :

- A_e est l'absorbance de l'étalon.
- P_e est la puissance de pompe ;
- DH_e l'amplitude du signal en déviation horizontale ;

Connaissant C , il est possible de déduire l'absorption de n'importe quel échantillon. Il faut noter que, quel que soit l'empilement, c'est le rapport de la puissance absorbée sur la puissance incidente qui est mesuré. Ainsi, même si le matériau diffuse, nous ne sommes sensibles qu'au phénomène d'absorption.

Choix de l'échantillon étalon

Le choix de l'étalon est délicat car il doit être stable dans le temps et présenter des caractéristiques similaires à celles de l'échantillon.

La déflexion photothermique dépend non seulement de l'absorption, mais aussi des propriétés optiques, thermiques et géométriques du substrat et du film. Ainsi, toute comparaison entre deux échantillons différents suppose que dans les conditions de mesures, les propriétés optiques et thermiques aient peu d'influence sur la déflexion photothermique, ou que les deux échantillons comparés aient des propriétés similaires.

D'autre part, le principe du calibrage consiste à comparer le signal photothermal aux pertes mesurées dans un spectrophotomètre classique, en supposant que les pertes par diffusion soient négligeables. Comme la détectivité de ces mesures est d'environ 10^{-3} , les échantillons de calibrage doivent être fortement absorbants (quelques % au moins).

On utilise une couche d'ITO¹ déposé sur substrat de silice H1 en pulvérisation cathodique, qui présente une absorption de 0.57% à 514 nm, mais aussi une grande stabilité dans le temps, contrairement à de nombreux autres éléments.

¹*Indium Titane Oxyde*

Annexe C

Mesure d'angles de contact

C.1 Physico-Chimie du mouillage [30, 31]

Depuis les travaux de GIBBS et de YOUNG, les notions de tension interfaciale, d'énergie de surface et leurs manifestations macroscopiques en termes de capillarité sont classiques. Il est évident aussi qu'il existe une relation directe entre les interactions aux échelles moléculaires entre molécules des phases en présence et la valeur de l'énergie interfaciale correspondante. Il est alors tentant d'utiliser les manifestations de la capillarité, et en particulier la notion d'*angle de contact*, pour caractériser une surface et les éventuelles modifications que l'on peut chercher à lui faire subir.

C.2 Notion d'énergie interfaciale

Pour assurer un contact au niveau moléculaire entre deux phases différentes 1 et 2, il est nécessaire de fournir une énergie libre par unité de surface d'interface formée, nommée *tension interfaciale* et notée γ_{12} . La valeur de cette énergie ou tension interfaciale est directement liée à la nature des interactions cohésives dans chacune des phases et aux interactions au contact entre phases. Toute mesure d'énergie interfaciale est donc porteuse d'informations sur les interactions à l'interface, au niveau moléculaire.

C.3 Mouillage total – Mouillage partiel

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur un solide, deux situations d'équilibre peuvent se produire, représentées sur la FIG. C.1. La première situation d'équilibre réalisée par le liquide est une situation dite de *mouillage partiel* (FIG. C.1 (a)), dans laquelle la goutte prend la forme d'une calotte sphérique, avec un angle de contact d'équilibre fini θ_e . La seconde situation est une situation de *mouillage total*, dans laquelle un film de liquide tend à progressivement recouvrir toute la surface solide disponible (FIG. C.1 (b)).

On peut définir le paramètre d'étalement S de ce système, en comparant l'énergie superficielle du solide en contact avec la vapeur et l'énergie superficielle du solide recouvert d'un film épais de liquide. S est donné par la relation suivante :

$$S = \gamma_{sg} - (\gamma_{sl} + \gamma_{lg}) \quad (\text{C.1})$$

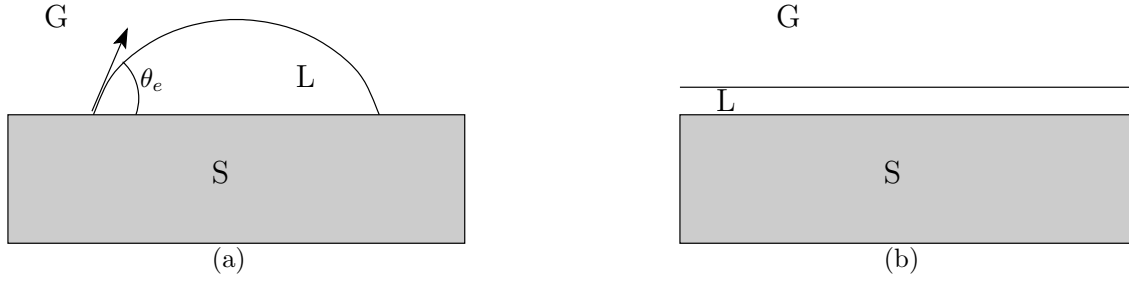


FIG. C.1 – Représentation schématique d’une goutte de liquide en mouillage partiel sur une surface solide (a) ou en mouillage total (b)

C.4 Angle de contact d’équilibre θ_e

Lorsque l’on est en mouillage partiel, l’angle de contact d’équilibre θ_e est donné par l’équation de YOUNG qui traduit l’équilibre mécanique de la ligne triple de contact liquide – solide – vapeur (gaz). L’équation de YOUNG donne la valeur de l’angle de contact d’équilibre d’une goutte de liquide posée sur le solide :

$$\cos \theta_e = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}} \quad (\text{C.2})$$

C.5 Matériel utilisé

La chaîne d’acquisition est schématisée sur la FIG. C.2. Le processus est très automatisé. Une seringue vient déposer une goutte de volume contrôlé ($1 \mu\text{l}$) à la surface de l’échantillon, face à la caméra. L’ordinateur¹ calcule alors automatiquement l’angle de contact.

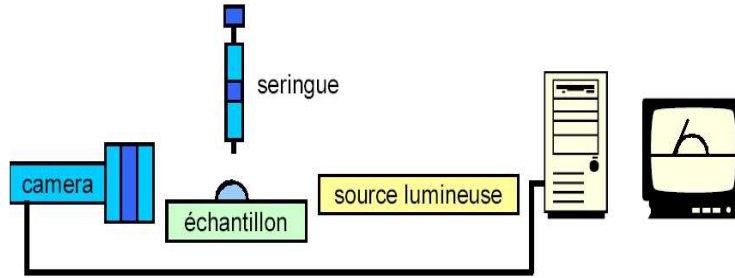


FIG. C.2 – Chaîne d’acquisition de la mesure d’angle de contact [32]

¹Digidrop DGD-Prod de GBX Instruments

Annexe D

Microscopie à Force Atomique

La Microscopie à Champ Proche permet, grâce à une pointe, de visualiser la topographie 3D d'une surface sur une échelle allant de quelques dizaines de microns à l'angström (échelle atomique). On distingue principalement, pour ce qui nous intéresse, la microscopie à effet tunnel (STM, *Scanning Tunneling Microscopy*) et la microscopie à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*).

D.1 Principe

Le principe consiste à approcher une sonde au voisinage d'une surface et à quantifier l'interaction entre la sonde et la surface. La pointe est rapprochée à environ 1 *nm* de la surface pour permettre l'interaction entre la sonde et l'échantillon, monté sur un piézo-électrique qui permet des mouvements dans les trois directions x , y et z (cf. FIG. D.2). Le relief de la surface étudiée fait varier l'interaction entre la pointe et la surface, ce qui permet d'en déduire la topographie globale.

En ce qui concerne la STM, la topographie est due à l'interaction de la pointe avec une surface conductrice où circule un courant de très faible intensité (de l'ordre du *nA*) appelé *courant tunnel*.

La microscopie à force atomique découle directement de la microscopie à effet tunnel, et ne diffère de celle-ci que par le type d'interaction. En effet, au lieu d'une interaction pointe – courant tunnel, c'est une interaction pointe – forces interatomiques qui s'exerce. Le grand avantage de cette technique est qu'elle peut être utilisée sur *tous types de surfaces*, conductrices ou non, et c'est bien sûr cette caractéristique qui nous intéresse plus particulièrement.

D.2 AFM en mode « tapping »

Un microscope à force atomique possède différents types de fonctionnements : mode contact, mode résonant ("tapping"), mode friction, et mode nano-indentation. Le mode qui nous intéresse ici, et que nous avons utilisé pour la caractérisation des monocouches de silane, est le mode dit de tapping.

La pointe, montée sur un piézo-électrique, subit un mouvement d'oscillation avec une fréquence déterminée. Un laser se réfléchit sur la pointe, et parvient ainsi jusqu'à des photodiodes. Deux paramètres peuvent être enregistrés lors de la présence d'un relief : la variation de la fréquence et de l'amplitude d'oscillation de la pointe (cf. FIG. D.2).

Les AFM commercialisés possèdent trois parties (cf. FIG. D.2) :

- la base, qui donne les ordres au scanner grâce au contrôleur ;
- le scanner, qui supporte l'échantillon, et bouge en (x, y) pour le balayage et en z pour l'asservissement ;

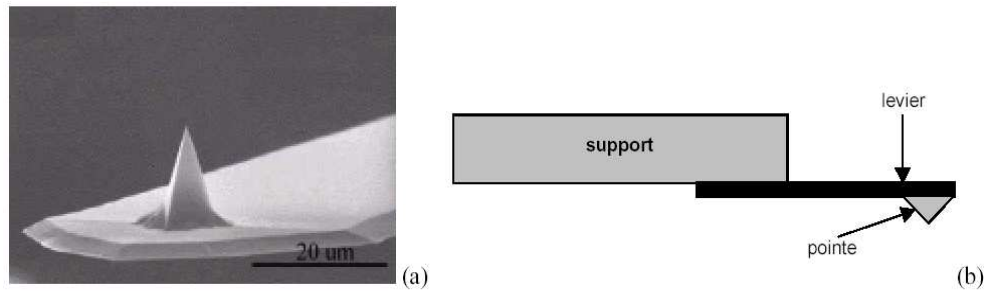


FIG. D.1 – (a) Image MEB d’une pointe d’AFM ; (b) Schéma d’une pointe d’AFM

- la tête optique, qui contient la source laser, le cantilever et la pointe appropriés, et les photodiodes.

Le faisceau laser provenant de la source vient se réfléchir sur un prisme miroir vers le bout de la pointe AFM, elle-même réfléchissante. Le faisceau se trouve alors réfléchi sur un miroir plan, pour être enfin reçu sur quatre quadrants photodiodes.

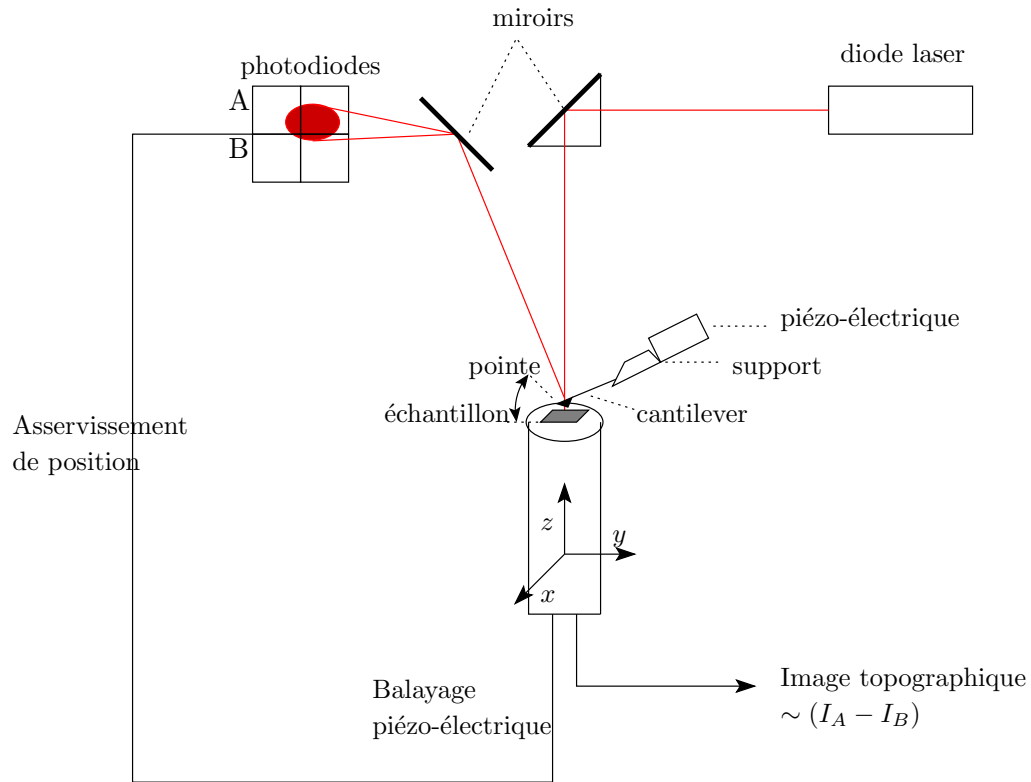


FIG. D.2 – Schéma simplifié de fonctionnement d’un microscope AFM en mode tapping

Index

- Affinité, 20
- Anticorps, 19
- Antigène, 20
- Biochiplab™, 40
- Bleaching, 13
- Capillarité, 62
- Colloïdes, 35
- Courant tunnel, 64
- Déterminant antigénique, voir épitope 20
- Énergie interfaciale, 62
- Épitope, 20
- Faisceau
 - pompe, 58, 59
 - sonde, 58, 60
- Fluorescence, 12
- Force
 - électrostatique, 20
- Immunoglobuline, 19
- JABLONSKI, Diagramme de, 12
- Lecture en continu, 33
- Liaison
 - hydrogène, 20
 - hydrophobe, 20
- Microsystèmes, 40
- Mirage, Effet, 35, 58
- Mouillage, 62
- Nanobilles d'or, voir Colloïdes 35
- Paratope, 20, 25
- Photobleaching, voir Bleaching 13
- Protéomique, 40
- Réflectivité de neutrons, 37
- STOKES, Loi de, 12
- Substance P, 21
- Traduction, 41
- Transcription, 41
- Trypsine, 41
- VAN DER WAALS, 20

Bibliographie

« *The secret to creativity is knowing how to hide your sources.* »

Albert Einstein

- [1] Laboratoire des Biomembranes et Signalisation Cellulaire, *Documentation Technique*, labo.univ-poitiers.fr/lbsc/FR/_Eq-Tech/imagcell/imagcell_doc00.htm
- [2] Molecular Probes, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, www.probes.com/handbook/
- [3] L.-M. NEUBURGER, *Étude de plusieurs approches de dosages immunologiques par fluorescence*, Mémoire de fin d'études, ENSAIA – INA-PG – CEA, 2002
- [4] Brevet n°EN0016940, Publication 2818662
- [5] X. DUBURCQ, *Élaboration d'une biopuce polypeptidique pour la détection sensible et spécifique d'anticorps*, Thèse présentée devant l'Université Lille II du Droit et de la Santé, 2003
- [6] C. A.K. BORREBAECK, « Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips », *Immunology Today*, **21**, 379-382 (2000)
- [7] P. ARENKOV, A. KUKHTIN, A. GEMMEL, S. VOLOSHCHUK, V. CHUPEEVA, A. MIRZABEKOV, « Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions », *Anal. Biochem.*, **278**, 123-131 (2000)
- [8] A. LUEKING, M. HORN, H. EICKHOFF, K. BÜSSOW, H. LEHRACH, G. WALTER, « Protein Microarrays for Gene Expression and Antibody Screening », *Anal. Biochem.*, **270**, 103-111 (1999)
- [9] W. KUSNEZOW & J. D. HEHEISEL, « Antibody Microarrays : Promises and Problems », *Biotechniques*, **33**, S14-S23 (2002)
- [10] *Virology*, University of Queensland, Australie, www.uq.edu.au/vdu/ELISA.htm
- [11] *The Biology Project*, University of Arizona, www.biology.arizona.edu
- [12] I. M ROITT, J. BROSTOFF, D. K. MALE, *Immunologie*, 3ème édition, De Boeck Université, 1994
- [13] B. HÆRNI, avec J. BRUGERE, J. CHAUVERGNE, J.-P. LE BOURGEOIS, J. MARTIN, J. ROBERT, *Dictionnaire des cancers de A à Z*, www.fnclcc.fr/fr/patients/dico/, Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
- [14] S. E. LEEMAN, F. LEMBECK, J. E. KRAUSE, *Substance P and Related Peptides : Cellular and Molecular Physiology*, New York Academy of Sciences, 1991
- [15] C. H. TABAN, *Substance P et Addiction*, www.phenix.ch/rapport02/R.html

- [16] J. L. HENRY, « Substance P and pain: an updating », *Trends in Neurosciences*, **3**, 95-97 (1980)
- [17] J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. STRYER, *Biochemistry*, Fifth Edition, Freeman, 2002
- [18] V. HANIN, O. DÉRY, D. BOQUET, M.-A. SAGOT, C. CRÉMINON, J.-Y. COURAUD, J. GRASSI, « Importance of hydrophobic complementarity for the binding of the neuropeptide Substance P to a monoclonal antibody : Equilibrium and kinetic studies », *Molec. Immun.*, **34**, 829-838 (1997)
- [19] The Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/
- [20] I. MINGAM, *Immuno-test sur chimie CEA-2*, INSA – CEA, 2004
- [21] J. BIBETTE, « Introduction à l'utilisation des colloïdes dans le domaine du diagnostic biologique », Conférence de l'Université de tous les savoirs, vidéo disponible en ligne à l'adresse www.canal-u.education.fr/canalu/affiche_programme.php?vHtml=&programme_id=1050762544
- [22] F. LASSAGNE, « Le bestiaire des colloïdes », *Science et Vie Hors-Série*, **228**, 62-67 (Septembre 2004)
- [23] R. CUBITT, G. FRAGNETO, « D17: The new reflectometer at the ILL », *Appl. Phys. A (Suppl.)*, **74**, S329-S331 (2002)
- [24] B. LEGRAND, *Les microsystèmes*, www.isen.fr/recherche/microsystem/
- [25] *Encyclopédie Wikipedia*, fr.wikipedia.org
- [26] B. SANDLER, M. MURAKAMI, J. CLARDY, « Atomic structure of the trypsin-aeruginosin 98-B complex », *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 595 (1998)
- [27] C. MARTIN, D. ZITOUN, L. RESSIER, F. CARCENAC, O. MARGEAT, C. AMIENS, B. CHAUDRET, M. RESPAUD, J.-P. PEYRADE, C. VIEU, « Self-organization of CoRh nanoparticles on chemical nanopatterns », *J. Mag. & Mag. Mat.*, **272-276**, e1363-e1365 (2004)
- [28] H. SUGIMURA, N. NAKAGIRI, *J. Photopolymer Sci. Technol.*, **10**, 4 (661)1997
- [29] H. LUMBROSO, *Thermodynamique*, 3ème édition, McGraw-Hill, 1984
- [30] J.-M. AUBRY & A. CARETTE, *Formulation et Modifications de surfaces*, EDP Sciences, 2001
- [31] P. DARANCET, G. PAUMIER, *Fonctionnalisation chimique de surfaces d'oxyde de silicium*, Projet multidisciplinaire, INSA – LNMO, Toulouse, 2004
- [32] S. LENFANT, *Monocouches organiques auto-assemblées pour la réalisation de diodes moléculaires*, Thèse présentée devant l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 2001
- [33] M. GOOSSENS, F. MITTELBAACH, A. SAMARIN, *L^AT_EX Companion*, CampusPress Référence, 2000
- [34] B. DESGRAUPES, *L^AT_EX, Apprentissage, guide et référence*, Vuibert, 2ème édition, 2003
- [35] *Process's - guide technique pour les industries de procédé*, www.processs.com
- [36] *Dictionnaire de Biologie en ligne*, www.dictionnaire-biologie.com

Résumé

Au cours de cette étude, nous avons transposé sur support plan un test immunologique utilisé au format capillaire au LERI (CEA-Saclay). Le modèle biologique choisi concerne un neuropeptide, la substance P (SP), et l'anticorps monoclonal anti-SP mAb SP31.

Le greffage de ces molécules a été effectué sur des lames de verre fonctionnalisées avec la chimie de surface CEA-2, développée au CEA - Létiet basée sur le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane. Les protéines et peptides se fixent de façon covalente aux fonctions aldéhyde du silane par leurs terminaisons amine NH_2 . Deux voies possibles ont été testées : greffage des anticorps et reconnaissance par des antigènes marqués (fluorophores), puis greffage des peptides puis reconnaissance par des anticorps marqués. Le greffage des sondes biologiques (anticorps ou antigènes) sur la surface, ainsi que les étapes de reconnaissance avec la cible en solution, ont été optimisés.

Afin de faciliter le transfert de ce procédé dans les microsystèmes, nous avons développé un protocole de silanisation CEA-2 en phase vapeur. Il a été caractérisé par mesure d'angle de contact et microscopie à force atomique. Son optimisation et sa validation sur lames de verre avec notre modèle anticorps – antigène a permis son transfert vers les microsystèmes pour la protéomique. En particulier, nous avons initié une étude sur la silanisation en phase vapeur dans les réacteurs de digestion peptidique développés dans le cadre du projet Biochiplab.

Mots clés : Immuno-test, substance P, anticorps monoclonal, 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane, phase vapeur, digestion peptidique

Keywords : fluorescent immunoassay (FIA), substance P, monoclonal antibody, chemical vapor deposition (CVD), 5,6-epoxyhexyltriethoxysilane, functionalization