



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**THESE**

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 20 février 2017 par

M. BONAMENT Alexi

Né le 25/12/1990  
à Versailles

\*\*\*\*\*

**CONCEPTION ET REALISATION D'UN BIOCAPTEUR EN UTILISANT L'IMPRESSION PAR  
MICROCONTACT POUR LA DETECTION DU TNF-A DANS LA SALIVE: DEPISTAGE DE L'INSUFFISANCE  
CARDIAQUE.**

\*\*\*\*\*

**JURY**

M. BARAKET Abdoullatif, Docteur Université Claude Bernard Lyon 1

M. ERRACHID EL SALHI Abdelhamid, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1

Mme. LANCELOT Sophie, Maitre de Conférences- Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

M. PAILLER-MATTEI Cyril, Maitre de Conférences, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

Mme. VINCIGUERRA Christine, Professeure- Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M. Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M. Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M. Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M. Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M. Philippe CHEVALIER

## Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

### SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M. Gilles RODE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directeur : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directeur : M. Denis BOURGEOIS
- Institut des Techniques de Réadaptation Directeur : M. Yves MATILLON
- Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine Directeur : Anne-Marie SCHOTT

### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. Fabien DE MARCHI
- UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL) Directeur : M. Pascal FOURNIER
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
- ESPE Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Madame Anne DENUZIERE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Madame Giovanna LOLLO (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)

Madame Carole SIANI (MCU – HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)  
Madame Florence RANCHON (MCU)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**  
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Madame Léa PAYEN (PU-PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
- **PHYSIOLOGIE**  
Monsieur Christian BARRES (Pr)  
Madame Kiao Ling LIU (MCU)  
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**
  - Monsieur Michel TOD (PU – PH)
  - Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
  - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
  - Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
  - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
  - Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
  - Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
  - Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
  - Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
  - Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
  - Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

## DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
  - Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
  - Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
  - Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
  - Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
  - Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
  - Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
  - Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**
  - Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
  - Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
  - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
  - Madame Florence MORFIN (PU – PH)
  - Monsieur Didier BLAHA (MCU)
  - Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
  - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
  - Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
  - Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
  - Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
  - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
  - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Karim MILADI (85<sup>ème</sup> section)  
Monsieur Antoine ZILLER (87<sup>ème</sup> section)

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, qui ont bien voulu être juges de mon travail de thèse. Mme. VINCIGUERRA, pour m'avoir suivie tout le long de mon parcours qui se finalise en étant la présidente de mon jury, merci. M. ERRACHID EL SALHI, pour m'avoir accepté et accompagné dans le monde des biocapteurs. M. BARAKET, pour m'avoir suivie tout au long du stage et avoir pu être disponible pour m'aider dans un nouveau domaine de recherche passionnant. M. PAILLET-MATTEI, pour m'avoir aidé tout au long de mes études d'ingénieurs pharmacien et d'avoir accepté d'être mon garant auprès de la faculté de pharmacie pour ma thèse. Mme. LANCELOT, pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je voudrais remercier à présent les membres de l'ISA qui m'ont aidé tout le long de mon projet. Mme. BOUCHET qui m'a aidé pour la rédaction de la thèse ainsi que, personnellement, pour m'avoir aidé pour le choix de ma carrière. Mme. ZINE pour son aide lors de la rédaction de l'article scientifique. Selim et Juan, les doctorants, pour m'avoir aidé également lorsque le moral n'était pas là.

Je voudrais maintenant remercier ma famille. Je remercie mes parents qui m'ont toujours supporté dans mes longues études et ont toujours crus en moi, merci infiniment. Merci à ma sœur, Joanne, pour m'avoir supporté tout au long de mes études et ce ne fut pas une sinécure. Merci à mon frère, Manu, toujours prêt à m'aider, surtout à faire la fête.

A présent je vais remercier mes amis. Ce sera par ordre chronologique de rencontre, ça sera plus simple :

Merci Gérald et Théo, mes deux amis d'enfances. Toujours fidèles au poste ! Que de souvenirs, tout évoquer serai une thèse à eux seuls. Merci pour tout.

Merci Vince, Jim, Alexis et Brice. Les meilleurs potes de lycées qu'on pouvait avoir. Tant de délires et de fous rires avec vous.

Merci Faustine, Amande, Jess, Nell et Popo. La touche féminine du lycée. Merci d'avoir pu canaliser (et de toujours le faire) les mecs stupides que l'on est.

Merci, Kim, Willou, Yass, Cyp et Glad. Les premiers potes de pharma, fidèles depuis la P1. Merci à vous pour toutes les soirées et les supports lors des galères.

Spécial remerciement pour les frères de Fal ! Popol, Ludo et Moux. Rien à dire, comme on dit dans le métier tmtc.



Un remerciement tout particulier pour Hugo. La bromance de pharma ! Ces années d'études avec toi ont été un plaisir. Si tout était à refaire, je n'hésiterai pas un seul instant. Merci mec !

Un gros remerciement groupé pour tous les potes de pharma qui reste : Coco, Labbé, JP, Cotade, Dadou, Mac, Lolo, Luc, Noured, Flo, Olive, Momo, Audrey, Clarisse, Belly, Bertuc, Ingrid, Ségo, Clem, Clodie, Marie(s) et Sophie. Mes années de pharma n'auraient jamais pu être aussi haute en couleur sans vous.

Merci à la confrérie de la petite poche : Valou et Vico. Les meilleurs amis que j'ai pu avoir en ingé. C'était 2 années de folie avec vous et le pire c'est que ça risque de continuer.

Un autre gros remerciement groupé pour tous les potes d'ingé : Damien, Cédou, Jordan, Alexis et Lucile. Pour m'avoir intégré au sein du milieu de l'ingénieur (et plus particulièrement de celui des HH).

## Abréviations

IC : Insuffisance Cardiaque

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

μCP: MicroContact Printing

SAMs: Self Assemble Monolayers – Mono couches auto assemblées

PDMS: PolyDiMethylSiloxane

MHDA: Acide 16-MercaptoHexaDecanoïque

EDC: 1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide

NHS: N-HydroxySuccinimide

PI: PolyImide

SPR: Résonance Plasmon de Surface

IL-6: InterLeukine 6

TNF-α: Tumor Necrosis Facteur alpha

PFDTs: 1H, 1H, 2H, 2H-PerFluoroDecylTriethoxySilane

TESUD: TriEthoxySilylUnDecanal

## Table des matières

Remerciements.....	7
Abréviations.....	9
Index des figures.....	13
Index des tableaux.....	18
Index des annexes.....	19
Introduction.....	20
I. Etat de l'art.....	22
I.1. Insuffisance cardiaque.....	22
I.1.1. Epidémiologie.....	22
I.1.2. Physiopathologie.....	22
I.1.2.1. Mécanismes d'adaptation.....	22
I.1.2.2. Mécanisme de l'insuffisance cardiaque décompensée.....	23
I.1.2.2.1. Augmentation permanente de la précharge.....	23
I.1.2.2.2. Augmentation de la post-charge.....	23
I.1.2.2.3. Mécanisme de la dyspnée d'effort.....	23
I.1.3. Symptomatologie.....	23
I.1.3.1. Symptômes.....	23
I.1.3.2. Signes cliniques.....	24
I.1.3.3. Classes d'insuffisance cardiaque.....	24
I.2. Le TNF- $\alpha$ , biomarqueur de l'insuffisance cardiaque.....	25
I.2.1. Présentation du TNF- $\alpha$ .....	25
I.2.2. Impact du TNF- $\alpha$ dans l'insuffisance cardiaque.....	25
I.3. Présence du TNF- $\alpha$ dans la salive des patients insuffisants cardiaques.....	27
I.4. Les biocapteurs.....	28

I.4.1.	Définition .....	28
I.4.2.	Biocapteurs mécaniques.....	29
I.4.3.	Biocapteurs électrochimiques .....	29
I.4.4.	Biocapteurs optiques .....	30
I.4.4.1.	Résonance plasmon de surface (SPR) .....	30
I.4.4.2.	Photoluminescence .....	31
I.5.	Technologies de fabrication des biocapteurs.....	32
I.5.1.	La lithographie douce.....	32
I.5.2.	L'impression par microcontact .....	32
I.5.2.1.	Principe de base .....	32
I.5.2.2.	Le tampon .....	35
I.5.2.2.1.	Création du tampon .....	35
I.5.2.2.2.	Limites et solutions actuelles .....	36
I.5.2.3.	« Encrage » .....	39
I.5.2.3.1.	Choix de l'encre .....	39
I.5.2.3.2.	Limites et solutions actuels .....	40
I.5.2.4.	Le substrat.....	42
I.5.2.4.1.	Substrats rigides .....	42
I.5.2.4.2.	Substrats souples .....	43
I.5.3.	La Biofonctionnalisation.....	44
II.	Expérimentations .....	47
II.1.	Produits chimiques et biologiques utilisés .....	47
II.2.	Méthodes .....	47
II.2.1.	Préparation du PDMS .....	47
II.2.2.	Fabrication d'un tampon PDMS .....	47
II.2.3.	Micro tamponnage .....	48

II.2.4.	Encrage.....	48
II.2.5.	Etudes de substrats .....	49
II.2.5.1.	Test de tamponnage sur lamelles de verre .....	49
II.2.5.2.	Préparation de plaques de PDMS .....	49
II.2.6.	$\mu$ CP du triethoxysilylundecanal (TESUD) sur le PDMS.....	49
II.2.7.	Biofonctionnalisation du PDMS .....	51
II.2.8.	Analyses du TNF- $\alpha$ avec le biocapteur .....	52
III.	Résultats et discussions .....	52
III.1.	Optimisation du micro tamponnage sur lamelles de verre .....	52
III.2.	Tamponnages sur PDMS .....	55
III.3.	Traitement du PDMS par silanisation au PFDTS.....	55
III.4.	$\mu$ CP du TESUD et biofonctionnalisation du PDMS .....	58
III.5.	Détection du TNF- $\alpha$ par le biocapteur .....	59
	Conclusion .....	60
	Références.....	63

## Index des figures

Figure 1. Voie de signalisation du TNF $\alpha$ et principaux effets délétères dans l'insuffisance cardiaque (19).....	26
Figure 2. Taux sérique de TNF $\alpha$ chez des sujets normaux et insuffisants cardiaques de classe I à III de la classification NYHA (20).....	26
Figure 3. Schéma explicatif des divers principes de biocapteurs (84).....	28
Figure 4. Principe de la détection optique pour un biocapteur à base de cantilever (28). ....	29
Figure 5. Principe de la SPR (85). ....	30
Figure 6. Détection par photoluminescence d'une surface biofonctionnalisée .....	31
Figure 7: Comparaison entre les différentes étapes de la photolithographie et celle de la $\mu$ CP (86).	33
Figure 8. Schéma comparatif entre la $\mu$ CP et le (+) $\mu$ CP (86).....	34
Figure 9. Structure chimique du Poly (diméthylsiloxane) (87). ....	35
Figure 10. Formation d'un tampon PDMS (39).....	36
Figure 11. Revêtements polaire pour tampon PDMS: APTES (aminopropyltriéthoxysilane); PEG (polyéthylène glycol); PAA (acide poly(acrylic) (43). ....	37
Figure 12. (a) Méthodes d'impression par microcontact conventionnelles (b) immergée dans l'eau. Dans l'air, la pression appliquée provoque une déformation du timbre. Lorsqu'il est submergé, le tampon est comprimé par l'eau (55).....	39
Figure 13. (a) Structure d'une monocouche auto-assemblée (SAM) sur substrat d'or. Les atomes de soufre se lient de façon covalente à la surface de l'or pour exposer les groupes terminaux à l'interface. Les chaînes alkyles forment un angle de $\pm 30^\circ$ avec la surface. Cette orientation maximise les contacts de Van der Waals entre les chaînes d'alkyle adjacentes. (b) Structure des alcanethiols typiques utilisés dans les études biologiques. (c) Diagramme d'un mixte établi en utilisant les structures de l'alcanethiols illustrées dans le panneau (b). (d) Méthode de biofonctionnalisation « classique ». (e) Méthode de biofonctionnalisation en milieu anhydride.....	40
Figure 14. Images par microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) de Cu déposés sur des motifs Pd catalytiques imprimés avec un tampon plat sur enduites Ti wafers Si / SiO <sub>2</sub> . Les échantillons ont été plaqués pendant 45 s dans un bain alcalin de tartrate de Cu contenant du	

formaldéhyde en tant qu'agent réducteur. Du O <sub>2</sub> plasma a été utilisé pour hydrophiliser le motif et du PDMS a été utilisé comme matériaux pour le tampon encreur (57).....	40
Figure 15. Schéma de l'impression par $\mu$ CP d'un hydrogel. Dans ce cas la pyridine aqueuse est utilisée comme encre de ligand, suivie par un dépôt auto-catalytique de nickel. Les nuances de gris des pyridines montrent leurs degrés d'adsorption, les plus foncés sont les plus adsorbés, dans le panneau 2. Le processus a montré les résultats de métallisation non sélectifs obtenus en l'absence de chauffage du substrat due à la migration d'encre induite par les sels dans la dispersion de catalyseur PD1. Le processus B montre la métallisation sélective d'une surface à « motifs pyridine » grâce à l'élimination de la migration ligand surface par alkylation thermique de l'adsorbat pyridinium avant la catalyse et la métallisation (88). .....	41
Figure 17. (a) Structures chimiques des trois polymères (PI, PEN et PET) et (b) Mécanisme proposé pour la liaison chimique du MPS (=3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane) sur les trois polymères activés (PI, PEN et PET), en haut, et la réaction le liaison possible entre ces polymères et le PDMS tous deux après traitement à l'O <sub>2</sub> plasma (73). .....	42
Figure 17. (a) Structures chimiques des trois polymères (PI, PEN et PET) et (b) Mécanisme proposé pour la liaison chimique du MPS (=3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane) sur les trois polymères activés (PI, PEN et PET), en haut, et la réaction le liaison possible entre ces polymères et le PDMS tous deux après traitement à l'O <sub>2</sub> plasma (73). .....	43
Figure 16. Schéma de préparation de la surface PI activée. Après le nettoyage par ultrasons dans de l'isopropanol, PI vierge est immergé dans une solution de KOH permettant l'hydrolyse du PI. Une deuxième immersion dans une solution d'AgNO <sub>3</sub> provoque un mécanisme d'échange d'ions entre K <sup>+</sup> et Ag <sup>+</sup> . Un traitement par plasma réducteur permet la formation des nanoparticules sur la surface par la réduction de l'argent en Ag (0) sur la surface de PI (72). .....	43
Figure 18. Schéma de réaction EDC-NHS. Dans notre cas (1) peut s'apparenter à la fonction à la surface du substrat (2) s'apparente à la molécule biologique. ....	44
Figure 19. Impression d'un acide aminé protégé par Boc sur une amine réactive SAM. Un timbre plat de PDMS à plasma oxydé encré avec un acide N-Boc-L-amino est pressé en contact avec une monocouche d'amine sur de l'or pour une série de réactions. Puis le timbre est enlevé, le substrat est rincé pour éliminer toutes les molécules non liées de manière covalente (78).....	45
Figure 20. Un tampon PDMS encré avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) est mis en contact avec un film mince de PS-b-PtBA sur du silicium oxydé. En l'absence de diffusion de TFA, l'acide	

hydrolyse les groupes ester du ter-butyle de la couche de PtBA exclusivement dans la zone de contact entre le tampon et le film. Activation locale du film de polymère pour plus de dérivation. L'activation des groupes acide carboxylique latéraux par NHS standard, donne des surfaces qui sont réactives vis à vis des molécules nucléophiles. Selon que le composé : actif (protéine) ou d'une couche de passivation (PEG). Celui-ci est couplé à la surface lors de l'étape initiale de couplage (formation d'une liaison covalente pour obtenir des liaisons amide solides), permettant la formation d'une borne positive (à gauche) ou négatif (à droite), image du motif de l'empreinte voulu. Étant donné que le couplage est effectué dans des solutions aqueuses tamponnées, la dénaturation des protéines due à la dessiccation est contournée (80). .....46

Figure 21. Agrandissement (x500) des observations par microscopie à fluorescence du tampon. ...48

Figure 22. Observation par microscopie à fluorescence (x100) du moule; Cercle ; dimensions :  $\varnothing_{ext} = 30\mu\text{m}$ ,  $\varnothing_{int} = 20\mu\text{m}$ . .....48

Figure 23. Triethoxysilylundecanal (TESUD).....49

Figure 24. Fonctionnalisation du PDMS avec des SAMs de TESUD. ....50

Figure 25. Réaction d'une amine sur un aldéhyde en imine puis stabilisation de l'imine en amine secondaire. Pour nous R3 ou R4 représente notre anticorps. ....50

Figure 26. Fixation de l'anticorps avec un chromophore sur les SAMs de TESUD .....51

Figure 27. Fixation de l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  sur les SAMs de TESUD .....51

Figure 28. Processus de la fixation du TNF- $\alpha$  sur l'anticorps primaire puis fixation de l'anticorps secondaire sur le TNF- $\alpha$ . .....52

Figure 29. Image microscopique (x1000) du tamponnage  $h=24,08\text{mm}$  ;  $P1=112,6\text{kPa}$  ;  $t=20\text{sec}$ . ....53

Figure 30. Image microscopique (x100) du tamponnage  $h=24,08\text{mm}$  ;  $P1=112,6\text{kPa}$  ;  $t=20\text{sec}$ . ....53

Figure 31. Image microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS sans traitement. ....55

Figure 32. Images microscopique (x1000) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement de surface par silanisation avec le PFDTs à  $80^\circ\text{C}$  pendant 6h. ....57

Figure 33. Images microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement par silanisation avec le PFDTs de surface à  $25^\circ\text{C}$  pendant 1h. ....57

Figure 34. Images microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement de surface, hauteur de tamponnage trop élevée.....57



Figure 35. Schéma explicatif du phénomène de formation d'une impression négative avec un tampon positif. ....	58
Figure 36. Image par microscopie à fluorescence (x400) d'un cercle de TESUD tamponné sur le PDMS activé après réaction avec un anticorps secondaire fluorescent. ....	59
Figure 37. Image par microscopie à fluorescence (x1000) d'un cercle de TESUD tamponné sur le PDMS activé après réaction avec un anticorps secondaire fluorescent. ....	59
Figure 38. Image par microscopie à fluorescence (x1000) d'un cercle biofonctionnalisé après interaction avec la solution de TNF $\alpha$ puis anticorps secondaire (« sandwich »).....	59
Figure 39. Image par microscopie à fluorescence (x100) d'un cercle biofonctionnalisé après interaction avec la solution de TNF $\alpha$ puis anticorps secondaire (« sandwich »).....	59
Figure 40. Matériels pour la préparation du PDMS.....	74
Figure 41. Prélèvement du monomère de PDMS à l'aide d'une seringue. ....	75
Figure 42. Agitation pour le mélange du monomère de PDMS et de son catalyseur. ....	75
Figure 43. Dégazage du mélange de PDMS. ....	76
Figure 44. Prélèvement à la seringue du mélange de PDMS dégazé.....	76
Figure 45. Nettoyage du support du tampon.....	77
Figure 46. Déposition du moule en silicium. ....	78
Figure 47. Insertion de la rondelle de Teflon.....	78
Figure 48. Préparation du moulage. ....	80
Figure 49. Pose du support du tampon sur le bloc en aluminium.....	80
Figure 50. Réglage de la vise du support.....	81
Figure 51. Injection du PDMS dans le trou du support de tampon.....	82
Figure 52. Retrait du surplus de PDMS sur les bords du tampon au scalpel. ....	83
Figure 53. Retrait du tampon du bloc en aluminium. ....	83
Figure 54. Retirer le moule en silicium du tampon.....	84
Figure 55. Protection du tampon avec un ruban adhésif.....	84
Figure 56. Retirer le piston. ....	85

Figure 57. Imprimante et outils annexes .....	86
Figure 58. Schéma basic de l'imprimante $\mu$ CP .....	87
Figure 59. Capture d'écran du logiciel $\mu$ CP avec les fonctions de base. Le panneau avec les fonctions supplémentaires est déjà affiché à droite, en marge.....	88
Figure 60. Schéma explicatif du déplacement de la tête d'impression.....	90
Figure 61. Interface optionnelle .....	90
Figure 62. Interface de configuration.....	92

## Index des tableaux

Tableau 1. Table récapitulative des différents matériaux utilisés pour la fabrication de tampons en $\mu$ CP (44).....	38
Tableau 2. Tableau d'expériences pour la définition de la pression de tamponnage.....	54
Tableau 3. Tableau d'expériences pour la définition de la hauteur de tamponnage.....	54
Tableau 4. Résultats de l'étude de mouillage de la surface de PDMS fonctionnalisé au PFDTS en fonction de leur type de traitement, l'ensemble des résultats peuvent être retrouvés en Annexe 4. .	56
Tableau 5. Tableau de méta-analyse des concentrations de TNF- $\alpha$ dans la salive en fonction de l'état de santé du patient avec recensement des techniques d'analyses utilisées.....	70
Tableau 6. Tableau des résultats bruts de l'étude de mouillage.....	94

## Index des annexes

Annexe 1 : Tableau de méta-analyse des concentrations de TNF- $\alpha$ dans la salive en fonction de l'état de santé du patient avec recensement des techniques d'analyses utilisées.....	70
Annexe 2 : Analyses des données de l'Annexe 1 et recherche d'une valeur « cut off » de concentration en TNF- $\alpha$ pour séparer les patients sains des patients sous IC. ....	71
Annexe 3 : Préparation du PDMS.....	74
Annexe 4 : Manuel d'utilisation de l'imprimante par microcontact.....	86
Annexe 5 : Résultats du l'étude de mouillage.....	94

## Introduction

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome fréquent. Chaque année une à cinq personnes pour mille en sont victimes dans les pays industrialisés, avec une prévalence de trois à vingt pour mille. La survie à un an, à n'importe quel stade, est de l'ordre de 65/100.000 (1).

De nos jours, de nombreux facteurs biologiques sont analysés afin de détecter au plus tôt, si possible avant les premiers symptômes, l'insuffisance cardiaque dans le but d'améliorer la prise en charge du patient.

Une des familles de marqueurs biologiques actuellement étudiées est celle des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) ou encore le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ). La corrélation entre l'augmentation de ces cytokines dans la circulation sanguine et le début des symptômes d'insuffisance cardiaque a été démontrée (2). Une autre découverte a permis une réelle avancée dans ce domaine : la recherche de ces cytokines dans la salive. Cette recherche permet aujourd'hui la conception de nouveaux tests de dépistages des maladies cardio-vasculaires par prélèvements salivaires moins invasif pour le patient que le prélèvement sanguin (3).

Actuellement le test le plus couramment utilisé pour la détection de ces facteurs est le test ELISA (4). Bien que le test ELISA soit une technique standard avec un niveau de détection de 0.01 à 1  $\mu\text{g/ml}$  et une sensibilité inférieure à 1.7  $\text{pg/ml}$ , celle-ci est limitée par son coût élevé. Elle requiert également des équipements spécifiques et un personnel qualifié. Ainsi le prix diffère selon la limite de détection et le type d'anticorps utilisé. Pour le TNF- $\alpha$  un test coûte environ 800€ (96 puits) (5).

De nos jours, les analyses biologiques doivent être de plus en plus rapides, précises et peu coûteuses afin de répondre à la demande du public et de réduire les dépenses public de la santé. Dans cette optique plusieurs chercheurs se sont intéressés au développement de nouveaux moyens d'analyses biologiques: les biocapteurs.

Différents types de biocapteurs ont été développés dans la littérature pour la détections de plusieurs types de biomolécules différentes. Notamment des biocapteurs optiques, électrochimiques ou encore mécaniques, qui cherchent à être plus performant que la technique ELISA en termes de limite de détection, de sensibilité, de coût et de facilité d'utilisation (6–10).

Notre objectif, dans le cadre de ce travail de thèse, est de concevoir un biocapteur sur substrat souple fonctionnalisé en utilisant l'impression d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  par micro-contact ( $\mu\text{CP}$ ). Ce biocapteur permettra de déceler la variation de la concentration en TNF- $\alpha$  contenu dans la salive par

une technique de détection optique par fluorescence. La finalité du projet est d'orienter le personnel de santé vers des tests complémentaires plus précis en vue d'adapter le traitement thérapeutique du patient.

Les principaux challenges rencontrés ont été:

- l'optimisation du tamponnage,
- La fonctionnalisation complète des zones dédiées,
- La mise en place d'une technique analytique reproductible ayant une limite de détection suffisante de l'ordre du pg/ml et permettant un dépistage précoce du risque d'insuffisance cardiaque.

Dans ce document, nous présenterons l'état de l'art des différents types de biocapteurs et leurs systèmes de détection suivi d'une brève description des techniques de lithographie douce. Le tamponnage par micro-contact et le TNF- $\alpha$  qui sont le cœur de notre projet seront traités dans la deuxième partie du document, avec une présentation détaillée des expérimentations, des résultats obtenus et leurs discussion. Nous montrerons à la fin que l'innovation sur laquelle nous avons travaillé a été de pouvoir biofonctionnaliser une surface polymérique à base de silicium par  $\mu$ CP afin de produire le biocapteur.

# I. Etat de l'art

## I.1. Insuffisance cardiaque

### I.1.1. Epidémiologie

Environ 1 million de sujets sont atteints d'insuffisance cardiaque, avec une incidence de 120 000 nouveaux cas annuels. Cette prévalence augmente avec l'âge soit 0,3 à 2% dans la population générale non gériatrique, celle-ci passe à 10% dans la population des plus de 80 ans (11).

Avec 240 000 hospitalisations par an le coût économique total attribué à cette pathologie est estimé à 1,6 milliard d'euros (11)(12).

En 2014 une étude ayant pour but de suivre l'évolution de la mortalité due à l'insuffisance cardiaque a été effectuée. Celle-ci montre qu'en 2010, 23 882 décès par insuffisance cardiaque ont été observés en cause initiale (CI) et 72 809 en causes multiples (CM). Le taux standardisé global de mortalité par insuffisance cardiaque était de 31.1 pour 100 000 personnes en CI et de 96.8 pour 100 000 en CM. Le taux de mortalité a diminué de 4% annuellement en CI et de 3.5% en CM entre 2000 et 2010 (13). Cependant, malgré une diminution importante de la mortalité globale due à l'insuffisance cardiaque entre 2000 et 2010 cette étude témoigne d'une fréquence préoccupante de cette maladie en France encore aujourd'hui.

### I.1.2. Physiopathologie

L'insuffisance cardiaque traduit l'incapacité du cœur à faire face aux besoins hémodynamiques de l'organisme, tout d'abord à l'effort, puis au repos. L'altération du fonctionnement cardiaque déclenche des mécanismes d'adaptation extrinsèques et intrinsèques destinés à maintenir un débit cardiaque suffisant.

#### I.1.2.1. Mécanismes d'adaptation

L'augmentation du tonus sympathique avec élévation des catécholamines intramyocardiques entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque et de la puissance contractile. Les fibres myocardiques s'allongent, ce qui accroît leur force contractile, la situation hémodynamique est donc rétablie, mais la réserve myocardique est diminuée (le cœur fonctionne sur ses réserves). Le cœur se dilate et s'hypertrophie.

### **I.1.2.2. Mécanisme de l'insuffisance cardiaque décompensée**

#### **I.1.2.2.1. Augmentation permanente de la précharge**

La pression télédiastolique ventriculaire ou précharge s'élève. Il s'en suit une élévation des pressions en amont, ainsi qu'une stase sanguine avec augmentation du volume sanguin circulant, sous l'effet d'un hyperaldostéronisme réactionnel.

#### **I.1.2.2.2. Augmentation de la post-charge**

La post-charge correspond à la pression artérielle. Étant donné que la pression artérielle est la résultante du débit cardiaque et des résistances périphériques, dans le cas de l'insuffisance cardiaque, la chute du débit entraîne une élévation des résistances périphériques, sous l'effet d'une stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'augmentation du volume sanguin circulant et la constitution d'œdèmes périphériques contribuent à élever les résistances périphériques.

#### **I.1.2.2.3. Mécanisme de la dyspnée d'effort**

Lorsque le patient insuffisant cardiaque effectue un effort, le ventricule gauche ne peut évacuer dans l'aorte la totalité du sang qu'il reçoit du ventricule droit et du lit vasculaire pulmonaire. Le sang s'accumule en amont du ventricule gauche: dans l'oreillette gauche, mais surtout dans les veines pulmonaires. Cette abondance de sang dans les veines pulmonaires diminue le volume d'air circulant, et donc la valeur fonctionnelle du poumon. Il s'y ajoute une turgescence des vaisseaux bronchiques qui majore la gêne respiratoire et surtout expiratoire, pouvant aller jusqu'au pseudo-asthme cardiaque.

### **I.1.3. Symptomatologie**

#### **I.1.3.1. Symptômes**

##### *I.1.3.1.1. Dyspnée*

La dyspnée d'effort est souvent difficilement interprétable chez les patients âgés du fait de l'existence de pathologies intriquées (pathologie respiratoire, anémie, inadaptation à l'effort, etc) et d'une mobilité limitée. La dyspnée de repos peut être absente.(14).

##### *I.1.3.1.2. Signes de bas débit*

L'asthénie est un deuxième symptôme fréquemment retrouvé souvent en rapport avec un bas débit ou une hypotension artérielle. Certains signes généraux non spécifiques tels que la confusion (15), des troubles du comportement, une désorientation temporo-spatiale, des troubles du sommeil, des chutes, une perte d'autonomie peuvent parfois représenter la seule manifestation clinique cardiaque chez le sujet très âgé (16).



#### *1.1.3.1.3. Œdèmes périphériques*

Ils sont fréquents chez les personnes âgées et non spécifiques. L'insuffisance cardiaque doit être évoquée au même titre que d'autres pathologies fréquentes (malnutrition, insuffisance ou compression veineuse, lymphoedème, pathologie rénale)(14).

#### **I.1.3.2. Signes cliniques**

##### *1.1.3.2.1. Râles pulmonaires*

Les râles pulmonaires inspiratoires (« crépitants ») sont souvent retrouvés en dehors de toute pathologie cardiovasculaire. Il faut les rechercher après la toux du fait d'une hypoventilation alvéolaire fréquente. Une fibrose pulmonaire peut également être responsable de crépitants pulmonaires chez les sujets âgés. En outre, l'œdème pulmonaire peut s'accompagner d'un bronchospasme aboutissant à une véritable dyspnée asthmatiforme pouvant orienter à tort vers une origine pulmonaire. L'absence de râles pulmonaires rend moins probable l'existence d'une insuffisance cardiaque gauche (14).

##### *1.1.3.2.2. Signes d'insuffisance cardiaque droite*

Les signes témoignant de l'élévation des pressions de remplissage droites sont l'hépatomégalie douloureuse, la turgescence des jugulaires et le reflux hépato-jugulaire, les œdèmes des membres inférieurs et la turgescence des jugulaires. Ces signes peuvent simuler une pathologie abdominale (14).

##### *1.1.3.2.3. Tachycardie*

Bien que la tachycardie se retrouve chez les patients jeunes, elle manque souvent chez le sujet âgé du fait de la coexistence fréquente de troubles de la conduction ou d'une sensibilité particulière aux médicaments bradycardisants (14).

#### **I.1.3.3. Classes d'insuffisance cardiaque**

La New York Heart Association (NYHA) (17) a donc créé un système pour classer la gravité de l'affection sur la base des symptômes :

*Classe I (aucun symptôme) :* Vous n'avez aucun symptôme et pouvez effectuer vos tâches quotidiennes sans être fatigué ni avoir le souffle court.

*Classe II (symptômes légers) :* Vous êtes à l'aise au repos, mais une activité modérée vous fatigue ou entraîne un souffle court.

*Classe III (symptômes modérés)* : Vous êtes à l'aise au repos, mais une activité physique même limitée vous fatigue ou entraîne un souffle court.

*Classe IV (symptômes sévères)* : Vous êtes incapable d'effectuer une quelconque activité physique sans inconfort et vous présentez certains symptômes au repos.

## **I.2. Le TNF- $\alpha$ , biomarqueur de l'insuffisance cardiaque**

### **I.2.1. Présentation du TNF- $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$  est une protéine de signalisation cellulaire (cytokines) impliqués dans l'inflammation systémique. C'est l'une des cytokines qui composent la réaction inflammatoire de phase aiguë. Elle est produite principalement par les macrophages activés, mais elle peut être produite par de nombreux autres types de cellules telles que les lymphocytes « T CD4 + », les cellules « NK », les neutrophiles, les mastocytes, les éosinophiles et les neurones.

Les cytokines ou les facteurs de croissance de la réponse immunitaire, sont essentiels pour propager et amplifier la réponse immunitaire. Les cytokines sont impliquées dans le recrutement de cellules dans la zone d'inflammation pour stimuler la division cellulaire, la prolifération et la différenciation. En conséquence, les cytokines (en particulier celles qui favorisent l'inflammation comme le TNF- $\alpha$ ) sont des éléments clés de l'activation immunitaire (18).

### **I.2.2. Impact du TNF- $\alpha$ dans l'insuffisance cardiaque**

Le TNF- $\alpha$  est produit par un grand nombre de cellules sous forme d'une pro-hormone ancrée dans la membrane plasmique et clivée par une enzyme de conversion pour libérer sa forme soluble active (figure. 1). Le TNF- $\alpha$  exerce alors ses effets sur deux récepteurs, TNFR1 (ou p55) et TNFR2 (ou p75), exprimés par la majorité des cellules nucléées (en particulier les cellules myocardiques), mais existant également sous forme libre soluble. Le TNFR1 est le plus abondamment exprimé et semble être la principale voie de signalisation permettant la médiation des effets délétères du TNF $\alpha$ , alors que le TNFR2 paraît jouer un rôle plus protecteur (19).

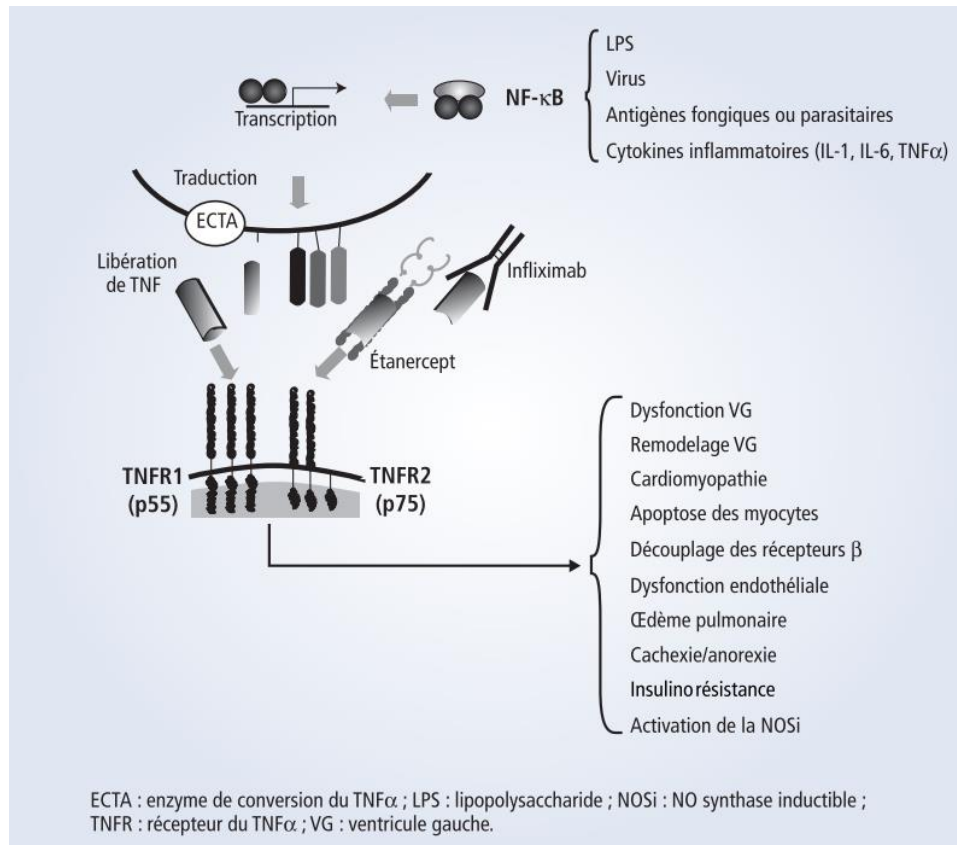


Figure 1. Voie de signalisation du TNFα et principaux effets délétères dans l'insuffisance cardiaque (19).

Les taux sériques de TNF-α sont plus élevés chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque ( classe I :  $1.95 \pm 0.54$ , classe II :  $2.63 \pm 0.48$ , classe III :  $6.4 \pm 1.9$  pg/ml) que chez les témoins sains ( $0.75 \pm 0.05$  pg/ml) (20) (Voir Figure 2). Le myocarde défaillant est capable de produire du TNF-α (21), ce qui peut favoriser le remodelage ventriculaire gauche (22) et provoquer un inotropisme négatif (23).

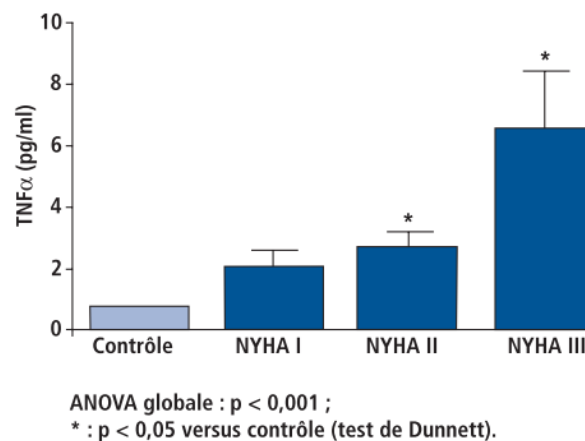


Figure 2. Taux sérique de TNF α chez des sujets normaux et insuffisants cardiaques de classe I à III de la classification NYHA (20).

### I.3. Présence du TNF- $\alpha$ dans la salive des patients insuffisants cardiaques

La corrélation entre le taux sérique et le taux salivaire de TNF- $\alpha$  n'a pas été prouvé chez patients sains (24). Cependant de nombreuses recherches ont montré une modification de la concentration salivaire en TNF- $\alpha$  entre les patients sains et les patients non sains (25,26) et plus particulièrement ceux atteints d'insuffisance cardiaque (27) en utilisant la technique ELISA pour l'analyse du TNF- $\alpha$  dans la salive. Une méta-analyse de ces publications a été effectuée pour déterminer les valeurs normales en TNF- $\alpha$  dans la salive d'un patient sain et celles d'un patient atteint d'insuffisance cardiaque (Voir Annexe 1 et Annexe 2). Cette analyse de la littérature nous a permis de déterminer la quantité de TNF- $\alpha$  théorique dans la salive chez un patient sain ( $3.73 \pm 1.32$  pg/ml) et chez un patient atteint d'insuffisance cardiaque ( $61.85 \pm 108.5$  pg/ml). Comme nous pouvons le remarquer l'écart-type de la concentration en TNF- $\alpha$  dans la salive est extrêmement élevé par rapport à la concentration normal. Cet écart-type reflète un des problèmes majeurs de l'analyse du TNF- $\alpha$  dans la salive puisque les concentrations sont extrêmement « personne dépendante » et varient beaucoup selon l'environnement du patient, son activité sportive, son sexe ou encore des autres pathologies présentes. Néanmoins suite à une normalisation des données (Annexe 2) un « cut off » potentiel a été trouvé de 6 pg/ml avec une sensibilité d'environ 70% et une spécificité d'environ 95%. Cette valeur de « cut off » ne peut être considérée comme valeur de référence mais il sera cependant utilisé pour cette étude.

## I.4. Les biocapteurs

### I.4.1. Définition

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques, capables de fournir des résultats quantitatifs et/ou qualitatifs.

Les biocapteurs combinent la sélectivité existante de la biologie, la puissance de traitement de données de la microélectronique et de l'optoélectronique modernes pour offrir de nouveaux outils performants d'analyse dédiés à la médecine, l'environnement et à l'industrie agro-alimentaire.

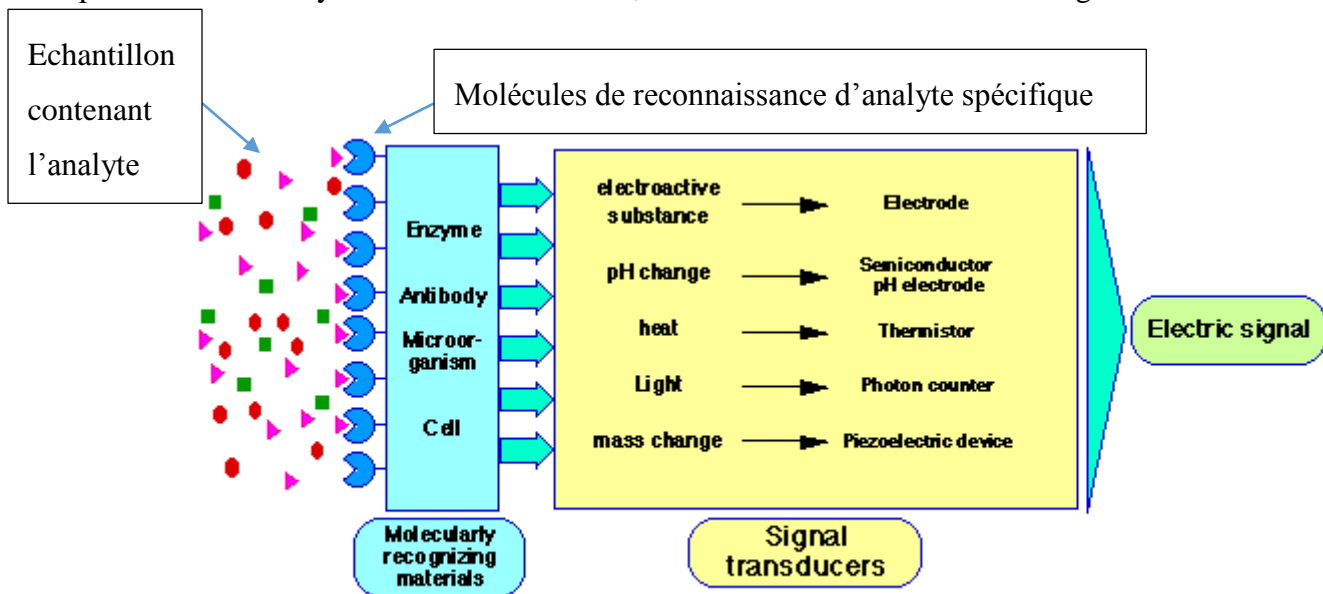


Figure 3. Schéma explicatif des divers principes de biocapteurs (84).

Les biocapteurs se composent de systèmes de biorecognition, généralement des enzymes ou des protéines de liaison, tels que des anticorps immobilisés sur la surface des transducteurs physico-chimiques.

Le terme immunocapteur est souvent utilisé pour décrire les biocapteurs qui utilisent des anticorps comme système de biorecognition. Les enzymes et anticorps de ces systèmes peuvent également comprendre des acides nucléiques, des bactéries et des organismes unicellulaires voir même des tissus entiers d'organismes supérieurs.

Les interactions spécifiques entre l'analyte cible et la couche de biorecognition complémentaire produit des changements physico-chimiques détectables et mesurables par le transducteur.

Le transducteur (Figure 3) peut revêtir plusieurs principes selon le paramètre à mesurer : électrochimique, optique, mesure de variation de masse ou de variations de température. Ces derniers sont parmi les plus communément utilisés.

#### I.4.2. Biocapteurs mécaniques

Le principe des biocapteurs mécaniques est basé sur l'analyse quantitative de la réaction entre la biofonctionnalisation de la surface et l'analyte grâce à la mesure de la déflexion du capteur. Cette déflexion est due au poids des molécules sur la plaque donc proportionnelle à leur quantité.

Le mouvement de la plaque peut être mesuré de différentes façons, notamment grâce à un système (matériaux) piézoélectrique. Cependant la technique la plus utilisée est celle utilisant la déflexion d'un faisceau optique (Figure 4). Le faisceau laser est réfléchi à partir du sommet de la plaque. Le déplacement du spot lumineux réfléchi, est proportionnel à la déviation du cantilever. Ce déplacement est détecté et traité à l'aide d'un photodétecteur sensible à la position (28).

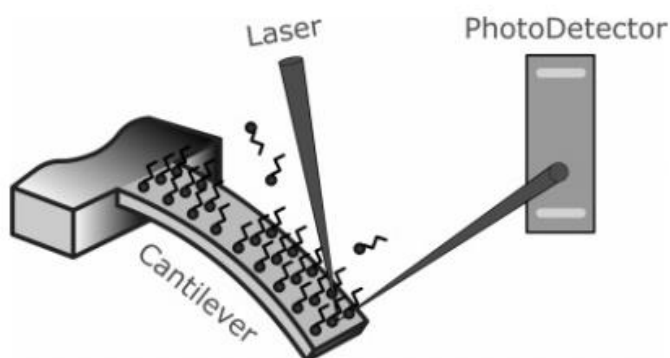


Figure 4. Principe de la détection optique pour un biocapteur à base de cantilever (28).

#### I.4.3. Biocapteurs électrochimiques

Dans ce cas, deux techniques électrochimiques sont habituellement utilisés: (1) La voltampérométrie cyclique; (2) l'impédancemétrie (29).

De nouvelles techniques basées sur la voltampérométrie ont été développées. Elles utilisent des canaux ioniques sur les molécules de surface permettant le passage des électrons. Pour ce type de biocapteur la conductance d'une population de canaux d'ions moléculaires est activée par l'événement de reconnaissance de l'analyte par le biocapteur (7).

Les biocapteurs, utilisant la mesure d'impédance, peuvent mesurer la résistance du passage des électrons d'une solution vers une électrode conductrice (ici le substrat). L'épaisseur de la couche

entre la solution et le substrat est modélisée par une résistance dite de transfert de charge. La fonctionnalisation du substrat ainsi que la réaction entre le substrat fonctionnalisé et les analytes induit donc à une augmentation de la résistance du passage proportionnelle, pour le premiers, à la quantité de matériel de reconnaissance sur la surface du biocapteur et, pour le second, à la quantité d'analytes ayant interagit avec la surface (10).

#### I.4.4. Biocapteurs optiques

##### I.4.4.1. Résonance plasmon de surface (SPR)

La SPR (Figure 5) est une technique analytique optique de surface. Elle permet d'analyser les variations d'interférences sur une surface conductrice donnée.

Le polariton de plasmon de surface est une onde électromagnétique de surface non radiative qui se propage dans une direction parallèle à l'interface de matériau diélectrique de permittivité négative. Etant donné que l'onde est située sur la limite du conducteur et du milieu extérieur (air, eau ou sous vide par exemple), ces oscillations sont très sensibles à toute variation de cette limite, par exemple l'adsorption des molécules à la surface conductrice (30).

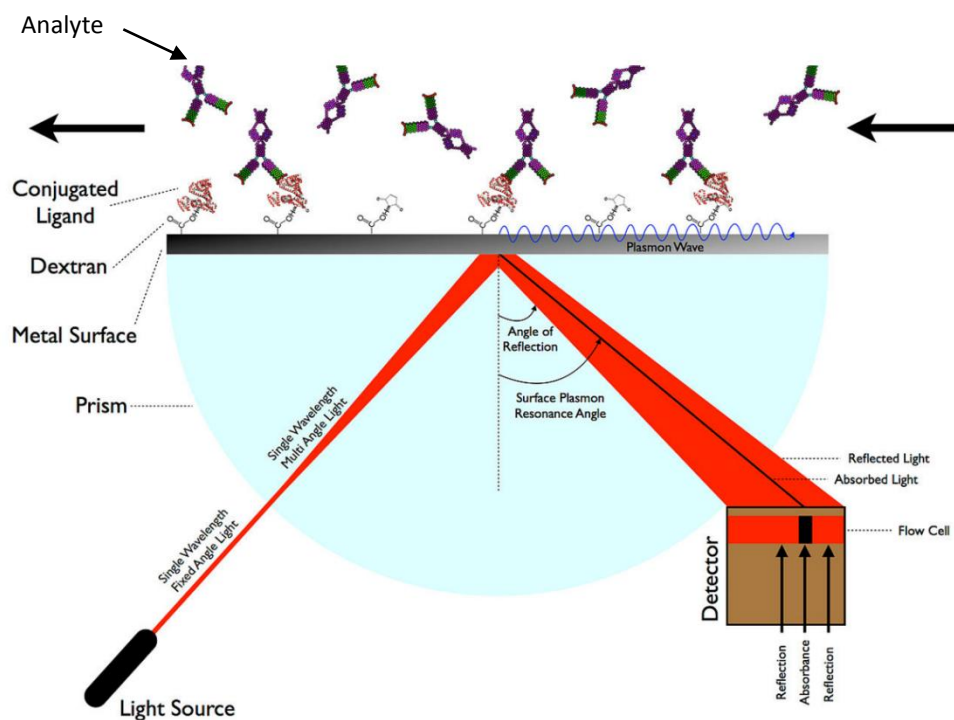


Figure 5. Principe de la SPR (85).

#### 1.4.4.2. Photoluminescence

Technique similaire à la technique « sandwich » ELISA (4). Dans ce cas, le substrat biofonctionnalisé est mis en contact d'une solution contenant l'analyte (sang, salive,...). Une interaction antigène-anticorps va se produire ainsi l'antigène sera fixé sur le substrat. Puis des anticorps spécifiques secondaires de l'antigène seront apportés pour induire la réaction. Les anticorps secondaires utilisés auront un fluorochrome pouvant produire une longueur d'onde propre

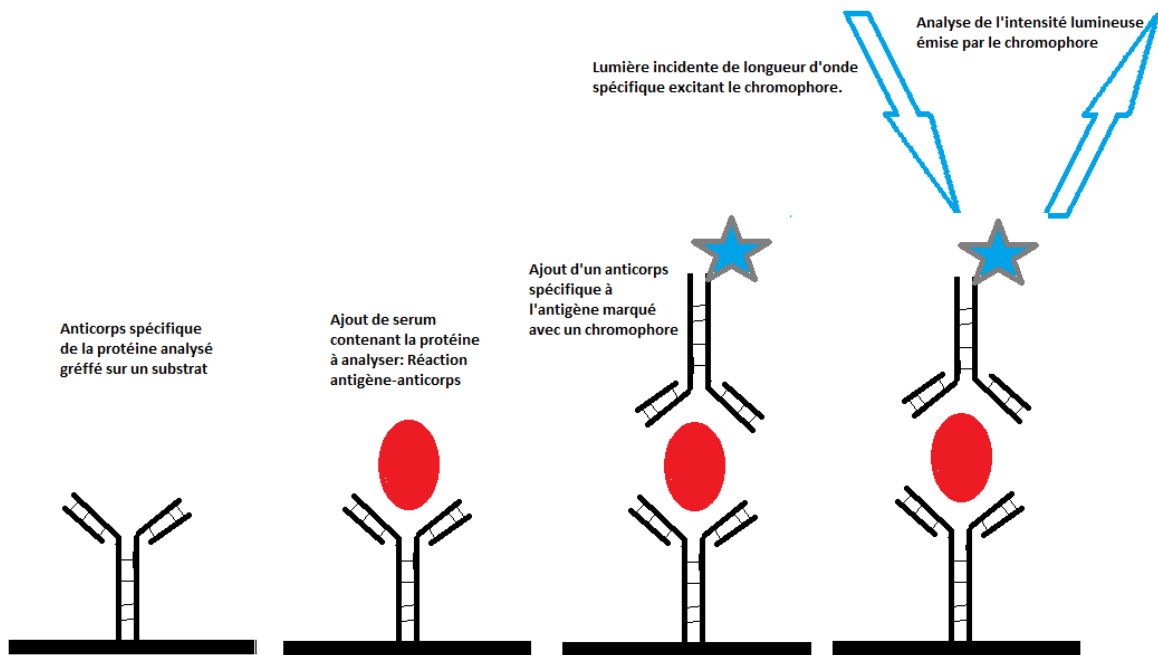


Figure 6. Détection par photoluminescence d'une surface biofonctionnalisée

une fois excité par une autre longueur d'onde spécifique plus énergétique.

L'intensité lumineuse émise après excitation du fluorochrome peut être mesurée. Elle est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés. Le substrat luminescent peut également être observé par microscopie à fluorescence avec des filtres spéciaux. Ceci permet d'avoir une image à la suite de la fixation des anticorps sur le substrat. En effet seul les zones fluorescentes (zones de fixation de l'anticorps secondaire) seront visibles au microscope à fluorescence (6).

Pour notre projet nous avons utilisé la méthode que nous avons développée, décrite Figure 6. Technique aussi performante que la technique ELISA de par sa sensibilité et sa reproductibilité tout en étant moins coûteuse.



## I.5. Technologies de fabrication des biocapteurs

Pour la fabrication de biopuces, différentes techniques de lithographie douce sont utilisées. Parmi lesquelles nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'impression par microcontact ( $\mu$ CP). Technique utilisée pour toutes nos réalisations.

Dans ce qui suit nous présenterons l'état de l'art de la  $\mu$ CP ainsi que les différentes problématiques que nous avons rencontrées.

### I.5.1. La lithographie douce

La lithographie douce est une technique basée sur l'auto-assemblage d'une réplique de moulage pour la micro- et la nanofabrication. Elle est à la fois efficace et peu coûteuse pour la fabrication de micro- et nano-structures.

En lithographie douce, on utilise un « timbre à motifs » présentant des structures en relief sur sa surface. Il est utilisé pour créer des modèles et structures de dimensions nanométriques allant de 30 à 100 nm.

En lithographie douce, il existe cinq techniques:

- La réplique de moulage (REM),
- Le moulage par microtransfert ( $\mu$ TM),
- Le micromoulage dans des capillaires (MIMIC),
- Le micromoulage par solvant assisté (SAMIM).
- L'impression par microcontact ( $\mu$ CP),

Pour notre travail nous avons utilisé essentiellement cette dernière technique.

### I.5.2. L'impression par microcontact

#### I.5.2.1. Principe de base

La  $\mu$ CP a été introduit par Mrksich et *al.* (31). Son objectif principal était de trouver un moyen rapide et facile de reproduire les modèles créés par photolithographie (32).

L'impression par microcontact exploite la capacité d'adsorption spontanée des thiols organiques pour former des monocouches auto-assemblées (SAMs) sur l'or (33).

Les SAMs de thiols avec des chaînes alkyle longues agissent pour l'or comme la couche photorésistante en photolithographie. Elles protègent la surface du substrat (Or) contre les attaques

des agents chimiques lors de l'étape de gravure (34). L'innovation en  $\mu$ CP a été l'utilisation d'un élastomère coulé et durci à partir d'un moule (Master motif) (Figure 7), en tant qu'outil pour générer un motif thiol SAM sur la surface d'or.

Le transfert effectif de l'encre sur le support d'or (substrat) est assuré par le contrôle de l'adhérence et du mécanisme de rupture au niveau des interfaces critiques entre timbre/encre et l'encre/substrat. La seule interface qui doit se lier de manière permanente est celle entre l'encre et le substrat. Celle entre le tampon et l'encre doit être réversible (35).

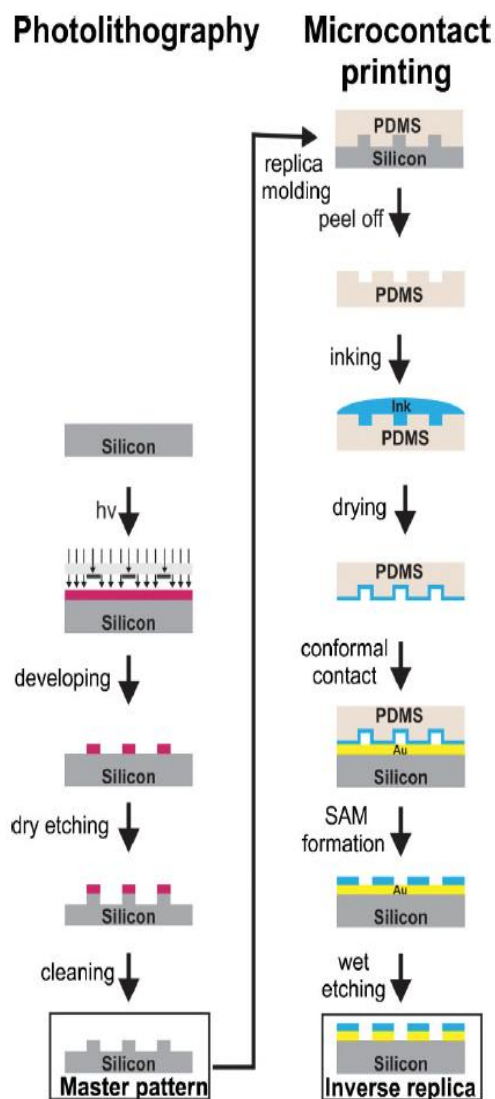


Figure 7: Comparaison entre les différentes étapes de la photolithographie et celle de la  $\mu$ CP (86).

A ce jour, deux types de  $\mu$ CP sont utilisés :

- La  $\mu$ CP « classique »
- La  $\mu$ CP positive ((+)  $\mu$ CP). Le terme «positive» (+) fait référence à la relation entre le moule et la réplique obtenue après gravure.

Dans la  $\mu$ CP d'origine une conception de moule donnée conduit à une réplique inverse «négatif», alors que le processus (+)  $\mu$ CP génère une réplique identique «positive» du moule d'origine (Figure 6). La réplique est réalisée en utilisant deux encres différentes dans le processus (36).

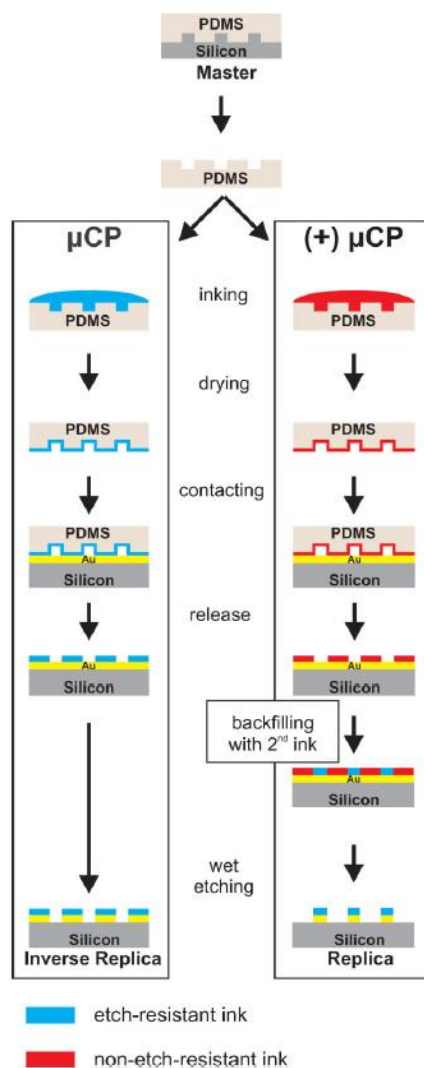


Figure 8. Schéma comparatif entre la  $\mu$ CP et le (+)  $\mu$ CP (86).

### 1.5.2.2. Le tampon

#### 1.5.2.2.1. Création du tampon

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Figure 9) est le matériau le plus utilisé pour faire des timbres par  $\mu$ CP. Le PDMS a un certain nombre de propriétés très bien adaptées à ce procédé. Il est suffisamment souple pour prendre forme après contact avec des surfaces même rugueuses. En outre, le PDMS est transparent, propriété importante pour des applications optiques ainsi que pour le contrôle des processus à l'œil nu et par microscopie.

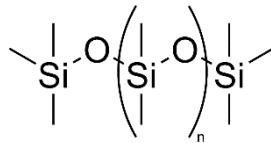


Figure 9. Structure chimique du Poly (diméthylsiloxane) (87).

Le PDMS est généralement préparé par réaction d'un copolymère d'éthylène - à terminaison PDMS pré-polymère – et d'un polydiméthylsiloxane comme agent de réticulation en présence d'un catalyseur de platine (Pt) à des températures élevées.

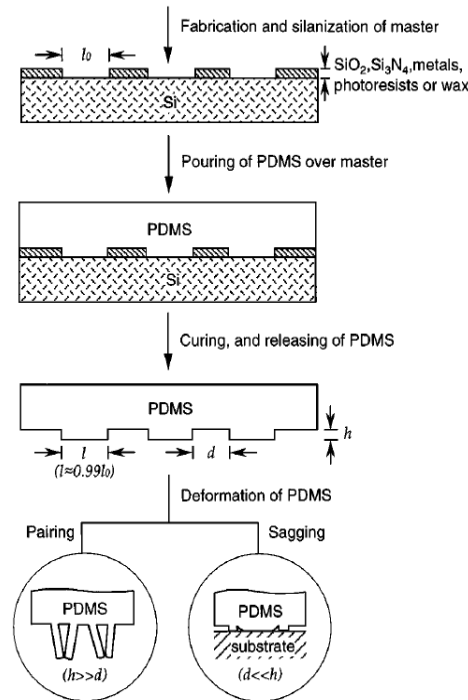
Le mélange pré-polymère liquide est versé sur un schéma non-adhésif. Le tampon forme ainsi une reproduction fidèle du modèle principale après durcissement. Il convient de noter que (en fonction du temps de durcissement et le rapport pré-polymère/agent de réticulation) le tampon PDMS contient un certain pourcentage de pré-polymère résiduel et/ou de PDMS à faible masse moléculaire pouvant se séparer pendant l'étape du  $\mu$ CP. Ces contaminants de faible poids moléculaire peuvent être extraits avec des solvants tels que l'éthanol. Ils sont une cause notoire d'artéfacts pendant l'étape du  $\mu$ CP (37).

Cependant les tampons PDMS présentent également un certain nombre de difficultés techniques:

- (1) : Le PDMS se rétrécit de  $\pm 1\%$  lors du durcissement et peut facilement gonfler en contact d'un certain nombre de solvants organiques non polaires tels que le toluène et l'hexane (38).
- (2) : L'expansion élastique et thermique du PDMS rend difficile l'obtention d'une impression de grande précision sur une grande surface. Elle peut aussi limiter l'utilisation de cette technique dans la fabrication et/ou la nanofabrication en multicouche (Plusieurs couches de tamponnage successives les unes après les autres).

- (3) : La faible rigidité de l'élastomère limite le rapport d'aspect des microstructures dans le PDMS. Par exemple, les gammes représentatives des valeurs pour les dimensions sont respectivement :  $h= 0.2$  à  $20\mu\text{m}$  ;  $d= 0.5$  à  $200\mu\text{m}$  ;  $l= 0.5$  à  $200\mu\text{m}$  (Figure 8) (39).

Lorsque le rapport d'aspect ( $h/l$ ) est trop élevé ou trop faible, le caractère élastique de PDMS provoquera des déformations du tampon et conduira à des défauts dans le motif (Figure 10). Delamarche *et al.* (40) ont montré que le rapport d'aspect des éléments du relief en PDMS doit être



**Figure 10. Formation d'un tampon PDMS**

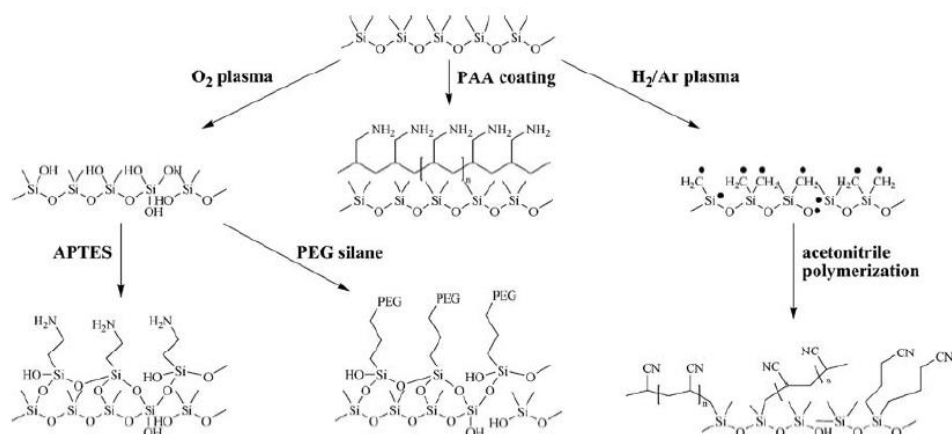
compris entre 0,2 et 2 pour obtenir des timbres ou des moules sans défaut. L'affaissement du PDMS causé par les forces de compressions entre le tampon et le substrat exclut l'utilisation de l'impression par  $\mu\text{CP}$  pour les modèles avec des caractéristiques largement séparées ( $d \geq 20 \cdot h$ ). En général, le PDMS le plus utilisé (Sylgard 184) permet d'obtenir des résultats optimaux avec des tailles de motifs supérieures à 100 nm (41).

#### I.5.2.2.2. Limites et solutions actuelles

Une des premières problématiques résolue du PDMS fut son hydrophobicité. Cette caractéristique du PDMS empêche l'utilisation de toutes encres hydrophiles. Cependant le PDMS peut être oxydé par UV/ozone pour changer cette caractéristique de surface. Le traitement par UV/ozone fournit un moyen facile de générer des films d'oxyde de silicium. Cette technique exclue les températures élevées de traitement qui peuvent détériorer les substrats organiques (42). En plus de l'oxydation, la

polarité de la surface de PDMS peut également être augmentée en appliquant un revêtement non soumis au recouvrement hydrophobe (Figure 11). Le principal avantage des tampons traité par ce type de revêtement est la conservation de la polarité de surface, qui peut atteindre dans certains cas 20 jours (43).

Une seconde problématique est la diminution de la taille des motifs à imprimer au maximum. Une des approches pour le faire a été l'étude du module de Young du polymère utilisé (44).



**Figure 11. Revêtements polaire pour tampon PDMS: APTES (aminopropyltriéthoxysilane); PEG (polyéthylène glycol); PAA (acide poly(acrylic)) (43).**

Le module de Young est la constante qui relie la contrainte de traction (ou de compression) et le début de la déformation d'un matériau élastique isotrope. Il représente la contrainte mécanique qui engendrerait un allongement de 100 % de la longueur initiale d'un matériau (il doublerait donc de longueur, si l'on pouvait l'appliquer réellement). Dans les faits, le matériau se déforme de façon permanente, ou se rompt, bien avant que cette valeur ne soit atteinte (45).

Pour reproduire des motifs inférieurs à 100 nm en utilisant des timbres d'élastomères, Michel et *al.* (46) ont développé un polymère nommé «hard-PDMS», noté «h-PDMS», avec un module de Young supérieur ( $\approx 10\text{MPa}$ ) au PDMS classique ( $\approx 0.6\text{MPa}$ ). Il y a, cependant, des compromis à prendre en considération pour la haute résolution du h-PDMS. Par exemple, le timbre peut se fissurer lors de la libération du moule. De plus la pression externe doit être plus élevée pour obtenir un contact conformationnel avec un substrat. Ceci peut créer, à long terme, des distorsions non uniformes sur les grandes zones de contact dues à la non uniformité de pression exercé par le timbre sur le substrat (47).

D'autres polymères non élastomères, durs, peuvent être utilisés pour les timbres : le poly méthacrylate de méthyle (PMMA) (48), le poly([3-mercaptopropyl]methylsiloxane) (PMMS)(49), le polystyrène (PS) (50) ou encore une résine époxy (51).

Ces dernières années, une nouvelle classe de matériaux a été le centre d'attentions: les perfluoropolyéthers (PFPEs) (52). Ces élastomères ont généralement un faible module d'Young, une haute perméabilité aux gaz, une faible toxicité et gonflent peu sous l'effet de solvants (53). De plus leurs surfaces peuvent être fonctionnalisées (54).

Il n'y a pas de critère unique pour le « meilleur » matériau pour les tampons de  $\mu$ CP. Différentes

<i>Material</i>	<i>Young's modulus (MPa)</i>	<i>Surface energy (erg cm<sup>-2</sup>)</i>	<i>Resolution (nm)</i>
PDMS	0.6	25	250
h-PDMS	10.0	35	50
s-PDMS	0.4	15	500
PMMA	8000.0	750	100
PS	5000.0	106	100
PFPE	0.8	11	15

**Tableau 1. Table récapitulative des différents matériaux utilisés pour la fabrication de tampons en  $\mu$ CP (44).**

applications nécessitent différentes combinaisons de propriétés.

Une autre approche pour la diminution de taille des motifs a également été étudiée. Comment éviter les collapsés tout en changeant les rapports h, l et d. Une nouvelle technique d'impression a été développée: l'impression par microcontact immergée (S $\mu$ CP) (Figure 12). Cette technique a été développée pour un motif thiol SAMs sur une surface d'or sous l'eau. Les tampons utilisés sont en PDMS mais les rapports géométriques (h, l, d) sont beaucoup plus élevés que ceux utilisés dans  $\mu$ CP classique (55).

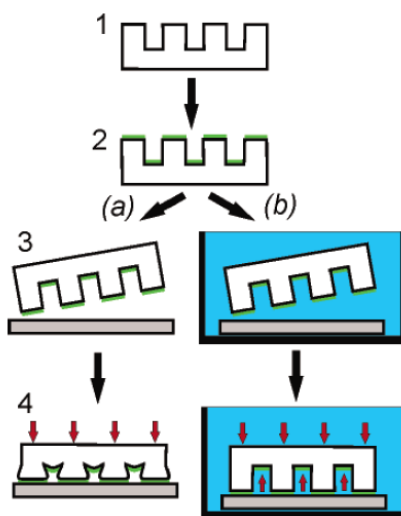


Figure 12. (a) Méthodes d'impression par microcontact conventionnelles (b) immergée dans l'eau. Dans l'air, la pression appliquée provoque une déformation du timbre. Lorsqu'il est submergé, le tampon est comprimé par l'eau (55).

### I.5.2.3. « Encrage »

#### I.5.2.3.1. Choix de l'encre

La  $\mu$ CP offre la possibilité de construire les propriétés d'une surface avec des détails au niveau moléculaire en utilisant des monocouches auto-assemblées (SAMs) d'alcanethiols sur un substrat revêtu d'un métal tel que l'or (Au), l'argent (Ag), le cuivre (Cu), le palladium (Pd) et le platine (Pt) (56).

Pour que la  $\mu$ CP se fasse, il faut que les SAMs aient une affinité covalente plus importante pour le substrat que pour le tampon. Les polymères sont particulièrement utiles comme encres pour la  $\mu$ CP. Ceux-ci ont tendance à adhérer fortement à la surface de contact et ne diffusent que lentement dans les zones de non-contact. Une large gamme de polymères - y compris les polymères conducteurs et de polymères biologiques - ont été utilisées comme encres pour la  $\mu$ CP.

L'impression par  $\mu$ CP d'une encre polymère fournit, en une seule étape d'impression, une surface de polymère microstructurée. Les encres polymères peuvent également être imprimées sur des substrats polymères. De cette façon, la  $\mu$ CP peut donner (Figure 13).un accès facile à des dispositifs électroniques organiques ainsi que des microréseaux biologiques (43)



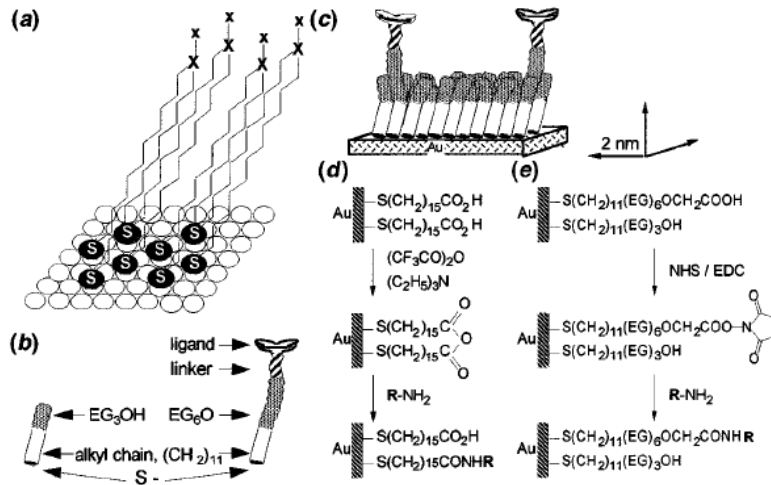


Figure 13. (a) Structure d'une monocouche auto-assemblée (SAM) sur substrat d'or. Les atomes de soufre se lient de façon covalente à la surface de l'or pour exposer les groupes terminaux à l'interface. Les chaînes alkyles forment un angle de  $\pm 30^\circ$  avec la surface. Cette orientation maximise les contacts de Van der Waals entre les chaînes d'alkyle adjacentes. (b) Structure des alcanethiols typiques utilisés dans les études biologiques. (c) Diagramme d'un mixte établi en utilisant les structures de l'alcanethiols illustrées dans le panneau (b). (d) Méthode de biofonctionnalisation « classique ». (e) Méthode de biofonctionnalisation en milieu anhydride.

#### I.5.2.3.2. Limites et solutions actuels

Un aspect critique de la réussite du  $\mu$ CP est le maintien de la fidélité du motif lors de l'impression. La migration de l'encre contenue dans le tampon avant l'impression [40,41] ou sur la surface du substrat pendant ou après l'impression [42,43] peut modifier les dimensions critiques et la justesse des motifs haute résolution à imprimer, et donc la fidélité du transfert de motif du tampon à la surface du substrat.

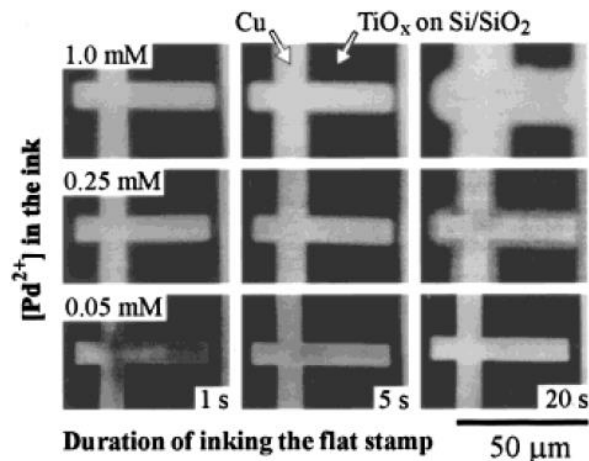


Figure 14. Images par microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) de Cu déposés sur des motifs Pd catalytiques imprimés avec un tampon plat sur enduites Ti wafers Si / SiO<sub>2</sub>. Les échantillons ont été plaqués pendant 45 s dans un bain alcalin de tartrate de Cu contenant du formaldéhyde en tant qu'agent réducteur. Du O<sub>2</sub> plasma a été utilisé pour hydrophiliser le motif et du PDMS a été utilisé comme matériaux pour le tampon encreur (57).

La migration de surface de l'encre peut être réduite (mais pas complètement éliminée) grâce à un contrôle rigoureux des paramètres du procédé, tels que le niveau d'encre présente sur le tampon [44-46] et le temps de contact d'impression (64) (Figure. 14) ou par la modification chimique du substrat [48, 49] (Figure. 15).

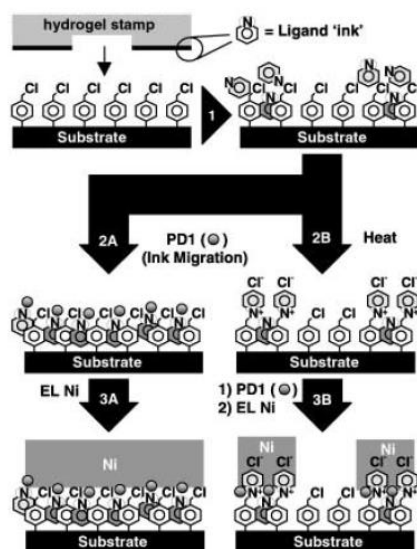


Figure 15. Schéma de l'impression par  $\mu$ CP d'un hydrogel. Dans ce cas la pyridine aqueuse est utilisée comme encre de ligand, suivie par un dépôt auto-catalytique de nickel. Les nuances de gris des pyridines montrent leurs degrés d'adsorption, les plus foncés sont les plus adsorbés, dans le panneau 2. Le processus A montre les résultats de métallisation non sélectifs obtenus en l'absence de chauffage du substrat due à la migration d'encre induite par les sels dans la dispersion de catalyseur PD1. Le processus B montre la métallisation sélective d'une surface à « motifs pyridine » grâce à l'élimination de la migration ligand surface par alkylation thermique de l'adsorbat pyridinium avant la catalyse et la métallisation (88).

En utilisant des encres avec un poids moléculaire accru ou avec de multiples points de fixation, on peut réduire le taux d'étalement de molécule d'encre à la surface. Cependant, cela peut-être au détriment de l'ordre de la monocouche formée (58,67). Les propriétés de gravure des longues chaînes thiol SAMs sur l'or sont déterminées par l'encombrement stérique des chaînes alkyle hydrophobes. Celles-ci sont denses et protègent l'or sous-jacente des espèces aqueuses réactives. Lorsque le nombre d'atomes de carbone est augmenté, le taux d'étalement de l'encre est diminué en fonction de son poids moléculaire accru (58). Pour augmenter encore la masse moléculaire, de nouvelles molécules d'encre à poids moléculaire élevé ont été conçus avec plusieurs groupements thioether (67).

### 1.5.2.4. Le substrat

Le substrat se caractérise tout d'abord par une affinité prononcée pour l'encre à imprimer. Ensuite le substrat est choisi pour ses caractéristiques spécifiques en fonction de l'application finale.

#### 1.5.2.4.1. Substrats rigides

Le premier substrat développé et utilisé a été un film d'or de faible épaisseur (feuille traité au titane) supporté sur une plaque de silicium ou de verre. Le titane sert de promoteur d'adhérence entre l'or et le support (68).

Les alcanethiols chimisorbés sur la surface d'or forment des alcanethiolate adsorbés avec une perte d'hydrogène. L'adsorption peut également produire de la vapeur (69). Une fois les SAMs déposés sur le substrat la nouvelle plaque peut à son tour être un substrat pour une nouvelle encre.

De nombreux autres substrats rigides ont été développés avec différents métaux tels que l'argent (Ag), le cuivre (Cu), le palladium (Pd) et le platine (Pt) (56) ou encore des polymères tels que le polyacrylamide en gel (70).

Cependant bien que le  $\mu$ CP soit bien développé dans la structuration de surfaces lisses, l'application du  $\mu$ CP sur des substrats souples et/ou avec une surface non-plane reste incertaine (71).

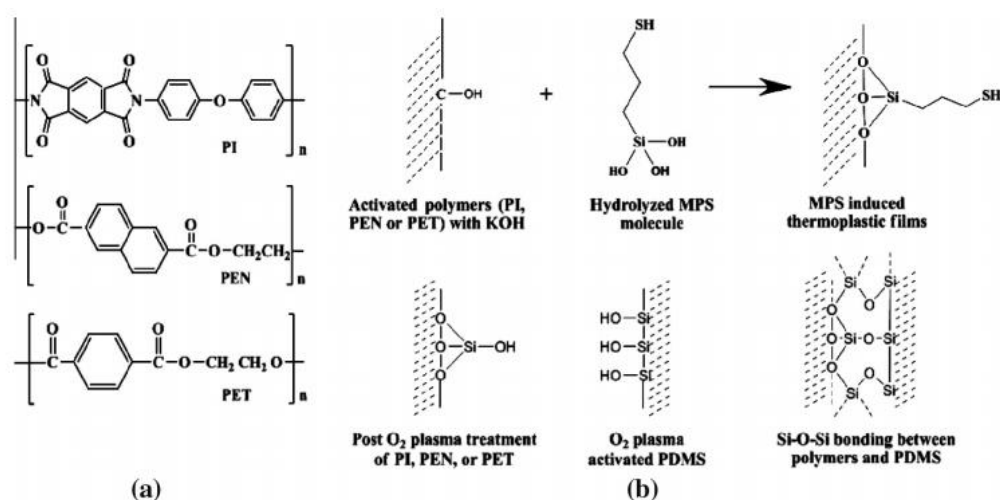


Figure 16. (a) Structures chimiques des trois polymères (PI, PEN et PET) et (b) Mécanisme proposé pour la liaison chimique du MPS (=3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane) sur les trois polymères activés (PI, PEN et PET), en haut, et la réaction de liaison possible entre ces polymères et le PDMS tous deux après traitement à l' $O_2$  plasma (73).

### I.5.2.4.2. Substrats souples

Les substrats souples ont beaucoup été étudiés notamment dans le cadre de la microélectronique. Les microélectrodes souples et stables sont de plus en plus utilisées avec le développement des dispositifs médicaux implantables. La formation de ces substrats se fait par modification chimique de la surface d'un polymère flexible. Ceci afin d'apporter de nouvelles fonctions de surface, de

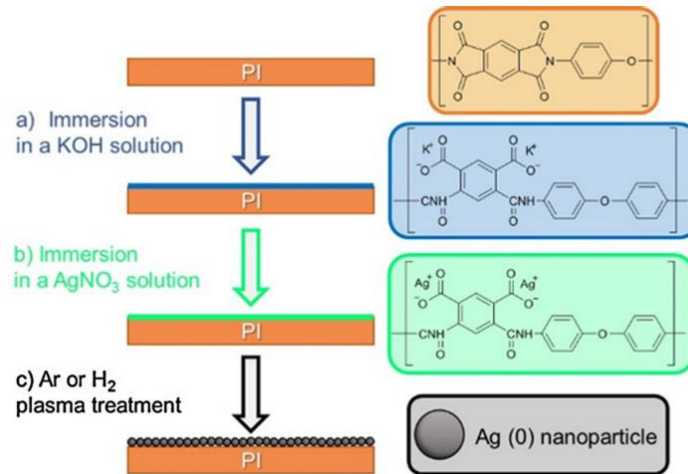


Figure 18. Schéma de préparation de la surface PI activée. Après le nettoyage par ultrasons dans de l'isopropanol, PI vierge est immergé dans une solution de KOH permettant l'hydrolyse du PI. Une deuxième immersion dans une solution d'AgNO<sub>3</sub> provoque un mécanisme d'échange d'ions entre K<sup>+</sup> et Ag<sup>+</sup>. Un traitement par plasma réducteur permet la formation des nanoparticules sur la surface par la réduction de l'argent en Ag (0) sur la surface de PI (72).

pouvoir ajouter une couche de métal (72) (Figure 16) ou de pouvoir micro tamponner une SAMs (73) (Figure 17).

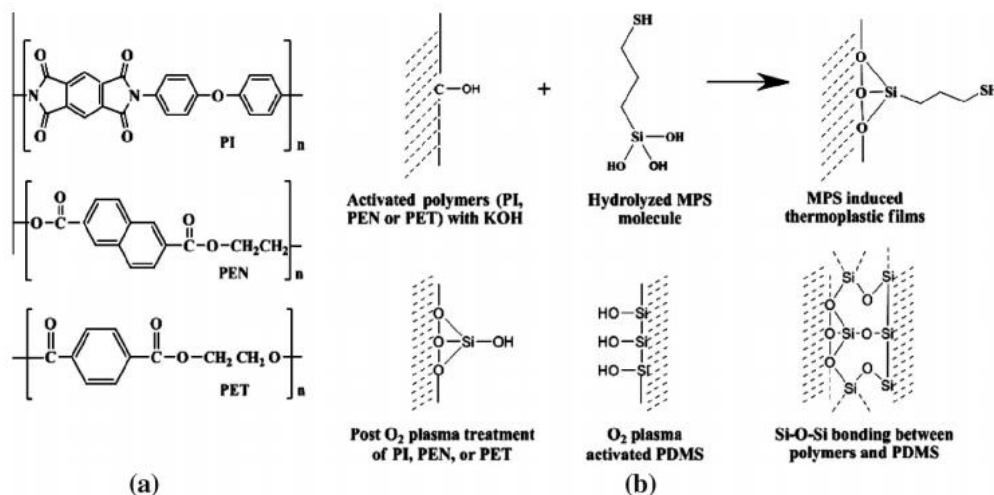


Figure 17. (a) Structures chimiques des trois polymères (PI, PEN et PET) et (b) Mécanisme proposé pour la liaison chimique du MPS (=3-Mercaptopropyl)triméthoxysilane) sur les trois polymères activés (PI, PEN et PET), en haut, et la réaction de liaison possible entre ces polymères et le PDMS tous deux après traitement à l'O<sub>2</sub> plasma (73).

### I.5.3. La Biofonctionnalisation

La biofonctionnalisation d'une surface permet d'étudier les réactions biologiques et cellulaires. Les molécules biologiques sont fragiles et peuvent être dénaturées rapidement si celles-ci sont soumises à des traitements chimiques ou physiques inadaptés. La  $\mu$ CP est, cependant, une technique adaptée pour la biofonctionnalisation puisque celle-ci ne dénature pas les molécules imprimées lors de son impression sur le substrat (74).

Une alternative pour la fonctionnalisation du substrat est la formation de SAMs à motif direct de molécules complexes grâce à la formation d'une couche réactive sur un substrat (75). Les SAMs

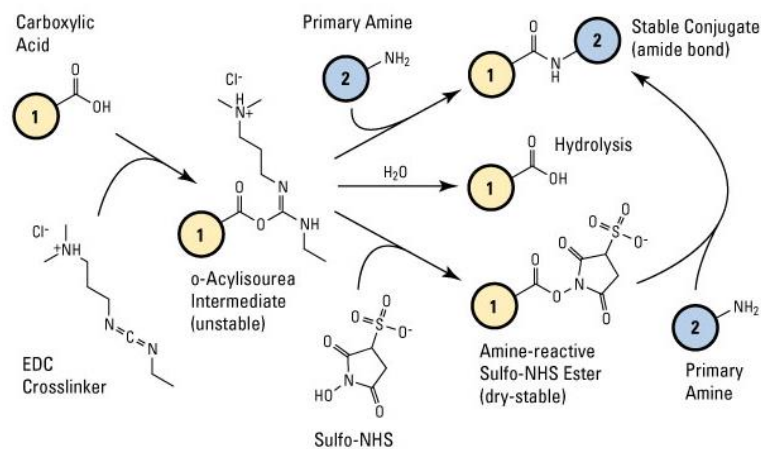
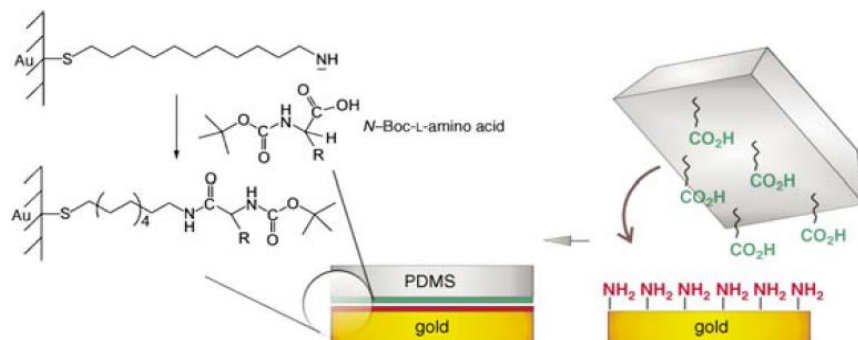


Figure 19. Schéma de réaction EDC-NHS. Dans notre cas (1) peut s'apparenter à la fonction à la surface du substrat (2) s'apparente à la molécule biologique.

sont fonctionnalisés de nouveaux par traitements chimiques pour apporter une fonction chimique précise. Une nouvelle  $\mu$ CP avec la molécule biologique souhaitée peut être effectuée afin de créer une nouvelle surface bio-fonctionnalisée par liaison entre la biomolécule et la SAMs (Figure 18).

En utilisant ce procédé, des amines et des poly (éthylène imines) ont été imprimés sur des réactifs anhydrides ou sur des SAMs à terminaison acide carboxylique sur l'or et l'argent [59,60].

Cette méthode a également été utilisée pour faire réagir des acides aminés N-protégés sur une surface confinée de groupes amino. Un tampon plat de PDMS est encre avec un N-Boc-L-amino acide (Boc (=tert-butoxycarbonyle) est une molécule protectrice des fonctions amines, ici utilisé pour protéger la fonction amine de l'acide aminé) puis mis en contact avec une SAMs aminé (Figure 19). Ce tamponnage permet alors d'imprimer des acides aminés sur de l'or sans les dénaturer (78).



**Figure 20. Impression d'un acide aminé protégé par Boc sur une amine réactive SAM. Un timbre plat de PDMS à plasma oxydé encre avec un acide N-Boc-L-amino est pressé en contact avec une monocouche d'amine sur de l'or pour une série de réactions. Puis le timbre est enlevé, le substrat est rincé pour éliminer toutes les molécules non liées de manière covalente (78).**

Une autre technique utilisée comprend des micro et nanostructures fonctionnelles bien définies, bio-interfaces, fabriquées par une impression réactive d'acide trifluoroacétique sur des films réactifs de copolymères [62, 63]. L'acide trifluoroacétique déprotège les chaînes latérales d'acrylate de tert-butyle présentes dans la couche superficielle des films de copolymère à blocs, ce qui rend le film chimiquement réactif avec une (bio) molécule d'amino-termination. (Figure 20)

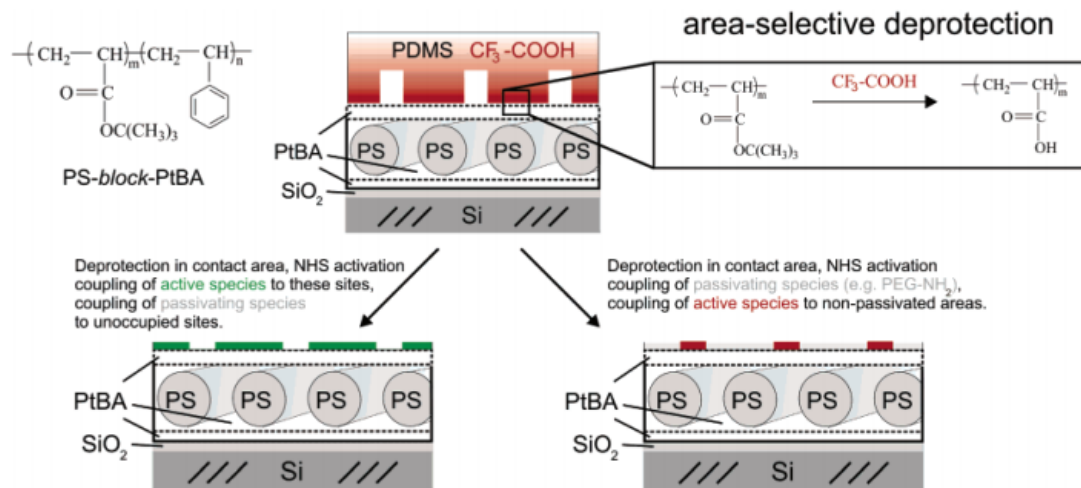


Figure 21. Un tampon PDMS encré avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) est mis en contact avec un film mince de PS-b-PtBA sur du silicium oxydé. En l'absence de diffusion de TFA, l'acide hydrolyse les groupes ester du ter-butyle de la couche de PtBA exclusivement dans la zone de contact entre le tampon et le film. Activation locale du film de polymère pour plus de dérivation. L'activation des groupes acide carboxylique latéraux par NHS standard, donne des surfaces qui sont réactives vis à vis des molécules nucléophiles. Selon que le composé : actif (protéine) ou d'une couche de passivation (PEG). Celui-ci est couplé à la surface lors de l'étape initiale de couplage (formation d'une liaison covalente pour obtenir des liaisons amides solides), permettant la formation d'une borne positive (à gauche) ou négative (à droite), image du motif de l'empreinte voulu. Étant donné que le couplage est effectué dans des solutions aqueuses tamponnées, la dénaturation des protéines due à la dessiccation est contournée (80).

## II. Expérimentations

### II.1. Produits chimiques et biologiques utilisés

Pour nos divers expérimentations et réalisations nous avons utilisé les produits suivants :

- Polydiméthylsiloxane (PDMS) (Sylgard® 184),
- 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorodécyltriéthoxysilane (PFDTs),
- Cyanoborohydrure ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ), Phosphate buffer saline (PBS) à pH 7.2 et Tétraborate décahydrate (Sigma Aldrich),
- Triéthoxysilylundécanal (TESUD) (abcr GmbH),
- TNF- $\alpha$  anticorps, TNF- $\alpha$  antigènes et les anticorps secondaires avec un chromophore (Rhodamine) (R&D System).

### II.2. Méthodes

#### II.2.1. Préparation du PDMS

La préparation du PDMS sera toujours faite de la même manière avec le kit Sylgard® 184, un rapport massique de 1 :10 entre le catalyseur et les monomères sera utilisé tout au long de l'expérimentation. La solution à 1 :10 est ensuite mélangée à la main avec un agitateur en plastique pendant une minute avant d'être dégazée le temps nécessaire pour retirer toutes bulles d'air dans la solution. Le dégazage se fait sous une cloche à l'aide d'une pompe dédiée à cet effet. Le dégazage est une phase importante de la fabrication, à laquelle il faut apporter un soin particulier, pour éviter les déformations ultérieures de l'élastomère et éviter de porter atteinte à l'intégrité du tampon et/ou du substrat (Annexe 2).

#### II.2.2. Fabrication d'un tampon PDMS

La fabrication d'un tampon en PDMS se fait par l'injection de la préparation de PDMS dans un châssis contenant le moule en silicium prédéterminé. Le choix du moule est une étape importante pour éviter les collapsés comme cela est décrit dans la bibliographie. Deux types de moules peuvent être utilisés, négatifs et positifs pour réaliser respectivement des tampons positifs ou négatifs. Cette dénomination (communément utilisée) permet de savoir si la forme du motif obtenue est fidèle à celle en contact avec le substrat, dans ce cas on est en présence de tamponnage positif. Si le substrat n'a pas été touché par la forme du motif mais par le reste du tampon, alors le tamponnage est dit



négatif. Une fois le PDMS injecté, le châssis est chauffé à 70°C pendant 3h avant d'être démoulé pour obtenir le tampon final (Annexe 2).

Le moule principalement utilisé lors de nos expérimentations est un moule négatif (permettant d'avoir un tampon positif) de forme circulaire « cercle » avec un diamètre interne de 20µm et un diamètre externe de 30µm (Figure 21-22).

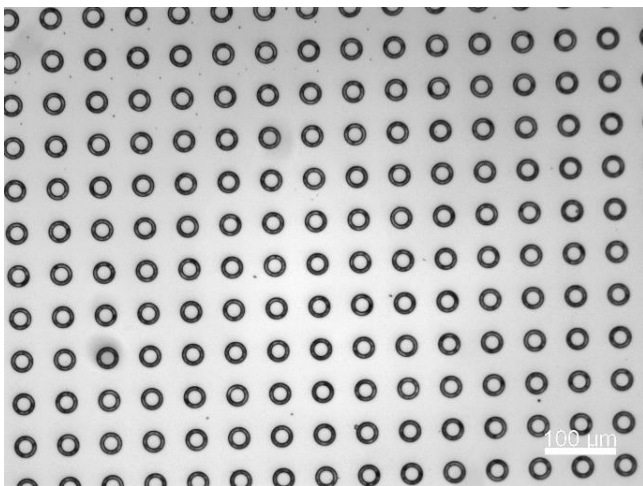


Figure 23. Observation par microscopie à fluorescence (x100) du moule; Cercle ; dimensions :  $s_{ext} = 30\mu\text{m}$ ,  $s_{int} = 20\mu\text{m}$ .

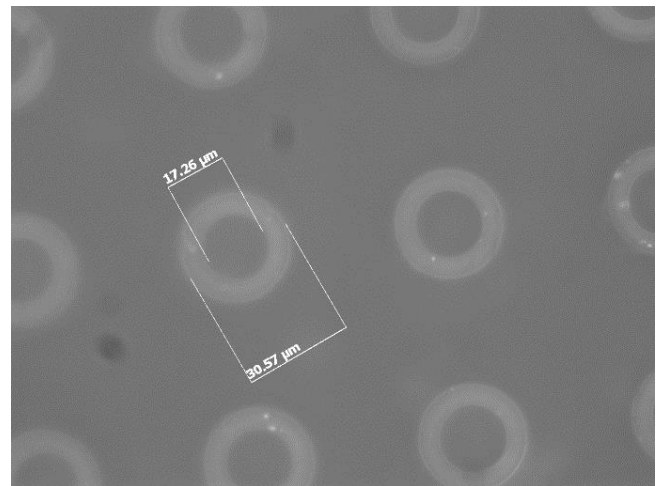


Figure 22. Agrandissement (x500) des observations par microscopie à fluorescence du tampon.

### II.2.3. Micro tamponnage

Comme nous avons pu le voir dans l'étude bibliographique, les différents paramètres de micro tamponnage (hauteur de tamponnage, pression appliquée au tampon et temps de tamponnage) sont déterminants pour la réussite d'un bon tamponnage. Le guide d'utilisation de l'imprimante est donné en Annexe 3.

### II.2.4. Encrage

Lors des premiers tests pour optimiser le micro tamponnage et tester la silanisation du PDMS, nous avons utilisé une encre fluorescente orange solubilisée dans l'éthanol. Celle-ci a été filtrée à 0,22µm pour éviter les agrégats du pigment orange non solubilisé. L'encre est déposée avec une seringue sur toute la surface du tampon et laissée au repos 5min (le temps de pause sur le tampon) puis séchée à l'air comprimé.

## II.2.5. Etudes de substrats

### II.2.5.1. Test de tamponnage sur lamelles de verre

Les premiers tests de tamponnage ont été effectués sur des lamelles de verres standards, utilisées pour la microscopie optique.

### II.2.5.2. Préparation de plaques de PDMS

Le substrat utilisé est une plaque de PDMS avec un traitement de surface permettant le tamponnage de l'encre sur la surface. La préparation du PDMS est la même que pour le tampon (détaillé dans le paragraphe II.2.1). Le PDMS est cependant coulé dans une boîte de pétrie à plat pour ensuite être mise dans le four à 70°C afin d'obtenir des plaques de PDMS planes et souple.

## II.2.6. $\mu$ CP du triéthoxysilylundecanal (TESUD) sur le PDMS

La biofonctionnalisation du substrat passe par une étape de silanisation du PDMS. Le silane utilisé doit avoir une fonction aldéhyde à son extrémité pour pouvoir réagir plus tard avec l'anticorps par réaction avec une amine de l'anticorps. La molécule choisit a été le triéthoxysilylundecanal (TESUD).

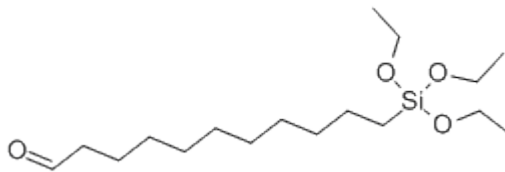


Figure 24. Triéthoxysilylundecanal (TESUD)

Nous utiliserons le PDMS comme substrat de départ comme support souple pour le biocapteur. Les plaques de PDMS sont préparées toujours avec le même protocole décrit dans le paragraphe II.2.5.2.

Le PDMS doit être activé par plasma/O<sub>2</sub> avant de pouvoir réaliser une  $\mu$ CP du TESUD efficace. Le tampon est encré avec une solution de TESUD 1% v/v dans 2ml d'éthanol et le PDMS est hydrolysé par plasma/O<sub>2</sub> (Diener Electronic PCCE Plasma-Surface-Technology) pendant 30 secondes. Le tamponnage devra être précis (Pression, Hauteur et temps de tamponnage) et rapide. La rapidité du  $\mu$ CP est cruciale en raison de l'état éphémère de l'activation du PDMS par plasma/O<sub>2</sub> qui revient à son état initial après 2 semaines et retrouve progressivement son hydrophobie au bout de 12h (81) (Figure 24). On laisse reposer la plaque pendant 30min à température ambiante (25°C) pour laisser le temps au TESUD de réagir avec le PDMS activé.

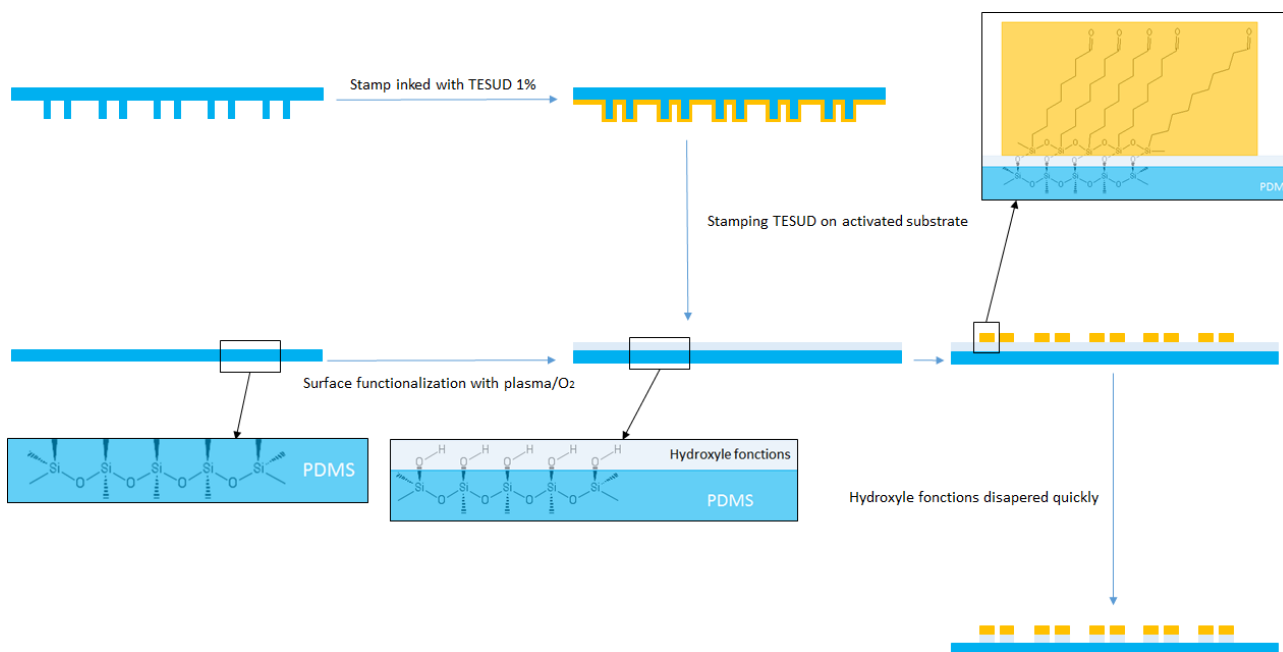


Figure 25. Fonctionnalisation du PDMS avec des SAMs de TESUD.

L'analyse du bon tamponnage des SAMs de TESUD se fait par fixation d'un anticorps avec un chromophore. L'anticorps possède une fonction amine sur l'extrémité du bras long de l'anticorps. Cette amine va réagir avec la fonction aldéhyde des SAMs de TESUD. Cette réaction provoque la formation d'un iminium entre l'amine et l'aldéhyde que l'on stabilise ensuite par un hydrure en amine secondaire (Figure 25).

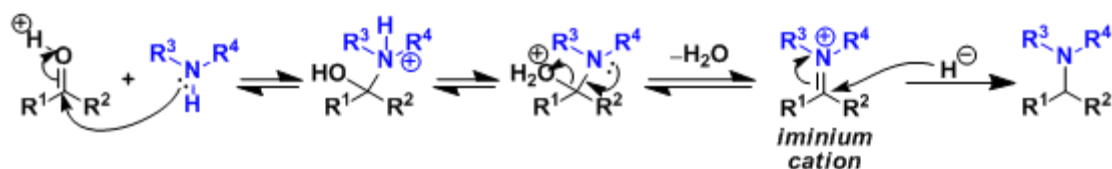


Figure 26. Réaction d'une amine sur un aldéhyde en imine puis stabilisation de l'imine en amine secondaire. Pour nous R3 ou R4 représente notre anticorps.

La réaction se fait avec 20µL d'anticorps possédant un chromophore à pH constant (pH=9,2) avec une solution tampon de sodium tetraborate decahydrate et la stabilisation par hydrure se fait avec le sodium cyanoborohydrure 4mM à température ambiante pendant 30min (Figure 26). L'analyse des résultats est faite par microscope à fluorescence (Axio ZEISS et HXP120C Kubler comme système

d'émission). Le chromophore lié à l'anticorps est la Rhodamine. Les échantillons sont observés par excitation de la Rhodamine avec une lumière monochromatique (550 ( $\pm 25$ ) nm) puis une détection de la lumière émise par la Rhodamine avec un filtre monochromatique (605 ( $\pm 70$ ) nm).

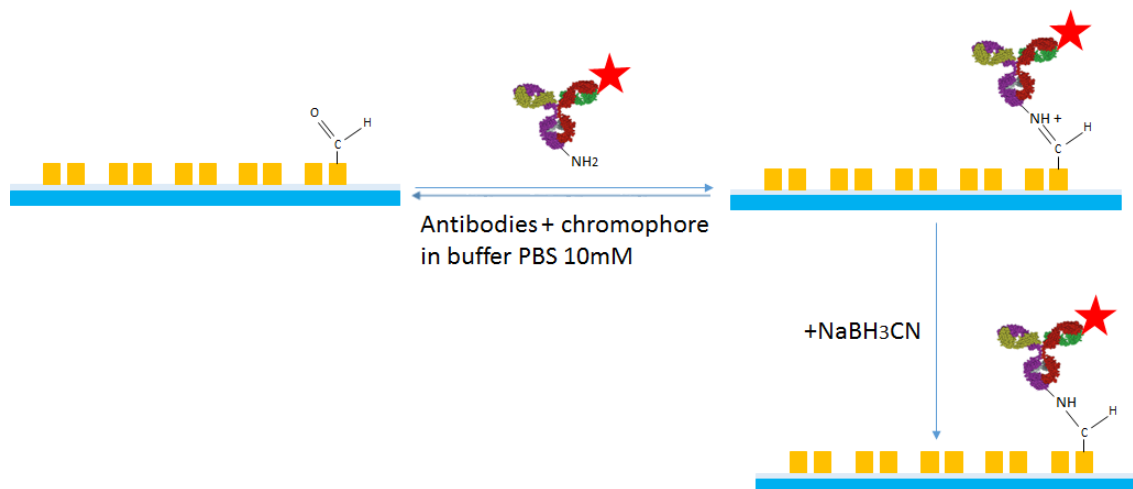


Figure 27. Fixation de l'anticorps avec un chromophore sur les SAMs de TESUD

### II.2.7. Biofonctionnalisation du PDMS

Ensuite, une fois le tamponnage de TESUD sur PDMS activé est optimisé, la biofonctionnalisation avec les anticorps anti TNF- $\alpha$  est effectuée avec le même principe que la technique précédente (paragraphe II.2.6). La réaction se fait avec 50 $\mu\text{g}$  d'anticorps primaires à pH constant (pH=9,2) avec une solution tampon de sodium tetraborate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) et la stabilisation par hydrure se fait avec le sodium cyanoborohydrure ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) 4mM à température ambiante ( $25^\circ$ ) pendant 30min (82). On lave ensuite le substrat avec la solution tampon (Figure 27).

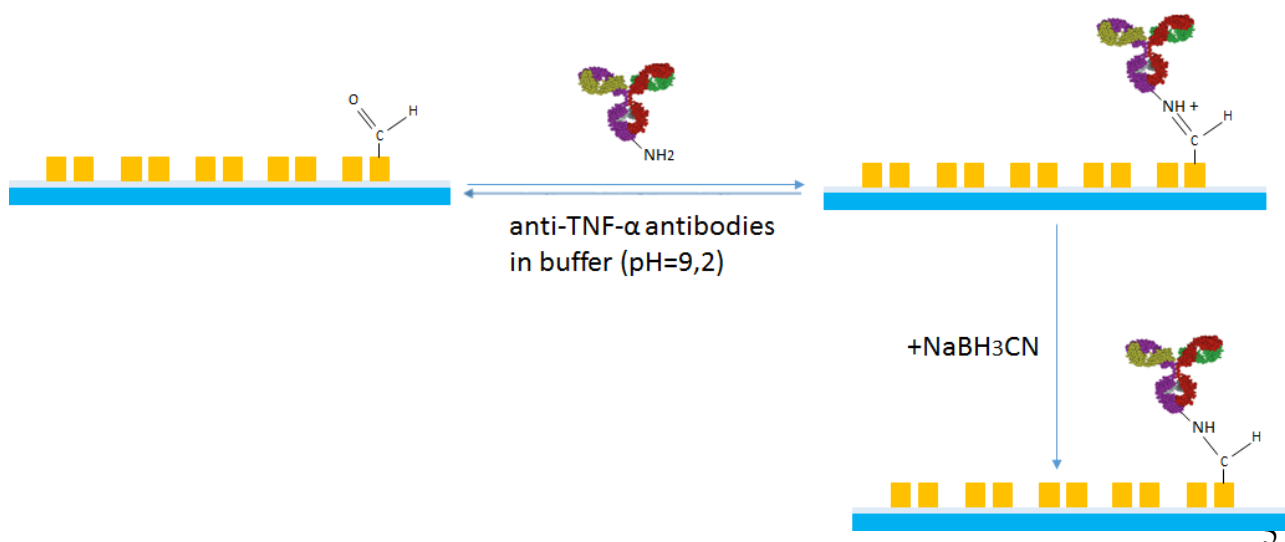


Figure 28. Fixation de l'anticorps anti-TNF- $\alpha$  sur les SAMs de TESUD

### II.2.8. Analyses du TNF- $\alpha$ avec le biocapteur

L'analyse du TNF- $\alpha$  consiste en la capacité de notre biocapteur à réagir avec le TNF- $\alpha$  en solution puis à détecter le complexe anticorps/antigène grâce à un anticorps secondaire avec un chromophore (Figure 28). Cette phase se fait en deux étapes :

- Mise en contact d'une solution de TNF- $\alpha$  50 $\mu$ g dans 1ml de tampon PBS (pH=7,2) pendant 30min puis lavage de la plaque avec la même solution tampon,
- Mise en contact d'une solution d'anticorps secondaires à 50 $\mu$ g dans 1ml de tampon PBS (pH=7,2) puis lavage de la plaque avec le tampon PBS pendant 30secondes.

Le chromophore lié à l'anticorps secondaire est la Rhodamine. Les échantillons sont observés par excitation de la Rhodamine avec une lumière monochromatique (550 ( $\pm$ 25) nm) puis une détection de la lumière émise par la Rhodamine avec un filtre monochromatique (605 ( $\pm$ 70) nm).

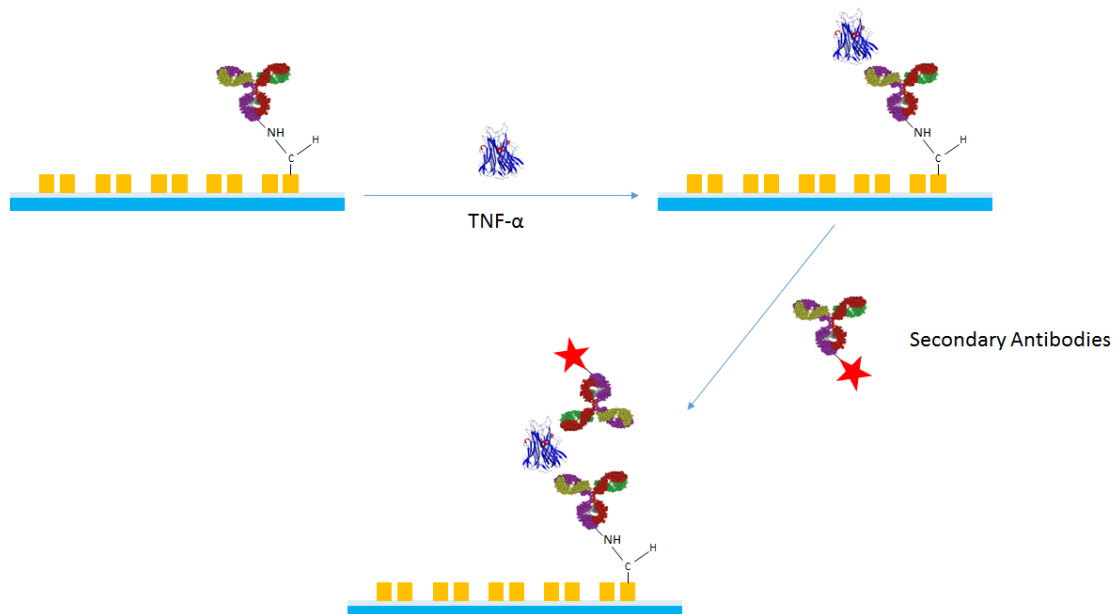


Figure 29. Processus de la fixation du TNF- $\alpha$  sur l'anticorps primaire puis fixation de l'anticorps secondaire sur le TNF- $\alpha$ .

## III. Résultats et discussions

### III.1. Optimisation du micro tamponnage sur lamelles de verre

De nombreuses expériences ont été effectuées afin de d'optimiser la hauteur de tamponnage et la pression de micro tamponnage sur la lamelle de verre. Les résultats tableau 2 et 3 montrent que la hauteur de tamponnage, la pression d'air optimal et le temps de contact pour le tamponnage sur lamelle de verre doivent être respectivement  $h = [24,08-24,09]$  mm,  $P_1 = [111,6-112,6]$  kPa et  $t = 20$

secondes. (Figures 28-30) La coloration des images est faite artificiellement avec le logiciel de traitement de données du microscope à fluorescence.

Les images seront préférentiellement colorées en rouge pour représenter la couleur réelle de l'encre sans traitement. Cependant certaines images sont en noir et blanc pour pouvoir apercevoir le contraste de l'encre en faible concentration.

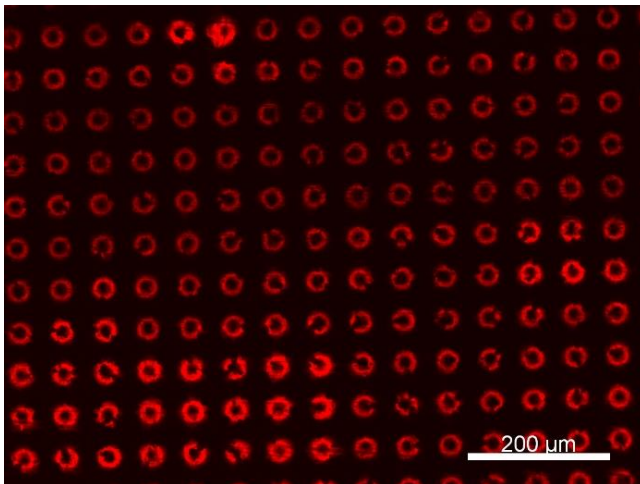


Figure 31. Image microscopique (x100) du tamponnage  
h=24,08mm ; P1=112,6kPa ; t=20sec.

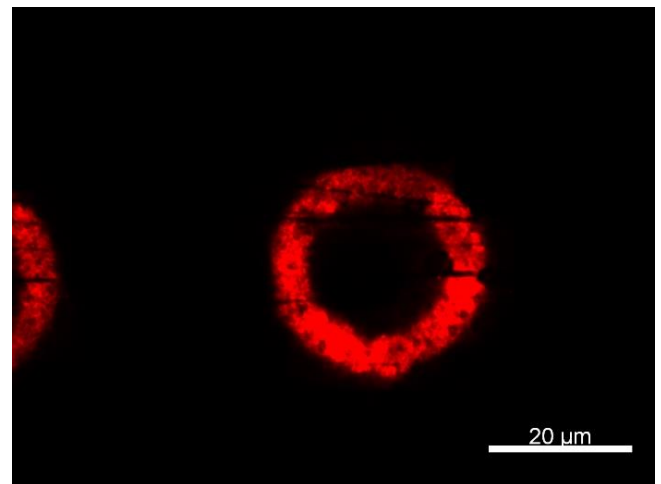


Figure 30. Image microscopique (x1000) du tamponnage  
h=24,08mm ; P1=112,6kPa ; t=20sec.

Fort de ces résultats d'optimisation, nous nous sommes intéressés à l'étude du substrat souple pour la fabrication de la biopuce. Le polymère le plus utilisé est le PDMS du fait de la richesse de la littérature complète sur le traitement de surface de ce matériau qui, une fois polymérisé, forme un substrat souple pouvant être facilement fonctionnalisé.

Expériences	h (mm)	P1 (kPa)	t (sec)	encre	Tampon	Surface tamponné	Résolution des paternes
1	24	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	une partie du centre du tampon	Mal définit
2	24,05	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	une partie du centre du tampon	Mal définit
3	24,1	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution
4	24,15	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Donut écrasé
5	24,2	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Donut écrasé
6	24,25	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Donut écrasé
7	24,06	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Mal définit
8	24,07	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Mal définit
9	24,08	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution
10	24,09	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution
11	24,11	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution
12	24,12	111,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution

Tableau 3. Tableau d'expériences pour la définition de la hauteur de tamponnage

Expériences	h (mm)	P1 (kPa)	t (sec)	encre	Tampon	Surface tamponné	Résolution des paternes	Images du $\mu$ CP
13	24,08	109,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Mal définit	
14	24,09	109,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Mal définit	
15	24,1	109,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Mal définit	
16	24,08	110,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution	
17	24,09	110,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution	
18	24,1	110,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	hétérogénéité de résolution	
19	24,08	112,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Bonne résolution	
20	24,09	112,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Bonne résolution	
21	24,1	112,6	20	orange filtré (0,22 $\mu$ )	N°4 AB	Complète	Donut écrasé	

Tableau 2. Tableau d'expériences pour la définition de la pression de tamponnage

### III.2. Tamponnages sur PDMS

Le premier obstacle au tamponnage sur le PDMS est l'absorption de l'encre orange utilisée par le PDMS. (Figure 31)

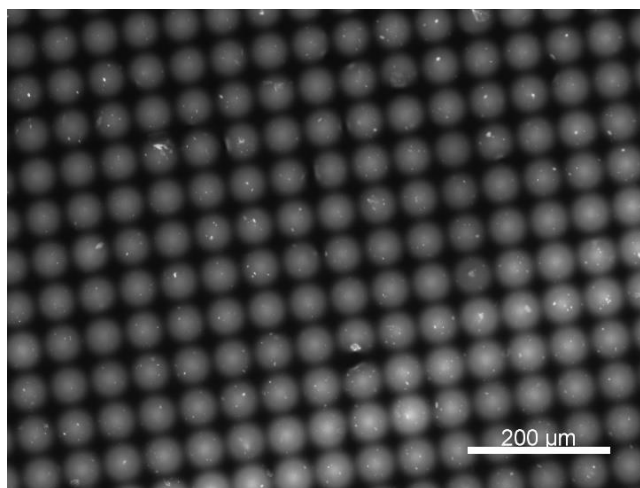


Figure 32. Image microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS sans traitement.

D'après l'état de l'art, un traitement de surface du PDMS par le PFDTS permet l'augmentation de l'hydrophobie surfacique (83). Nous avons opté pour cette technique pour tester la silanisation d'une plaque de PDMS.

### III.3. Traitement du PDMS par silanisation au PFDTS

Les plaques de PDMS ont été hydrolysées par plasma/O<sub>2</sub> pendant 30 secondes afin de fonctionnaliser la surface du PDMS avec des fonctions hydroxyles (OH). Puis elles sont trempées dans une solution de PFDTS de 10mM dans de l'éthanol à des températures différentes (25°C ou 80°C) et laissées entre 1 à 6 heures afin d'évaluer l'optimisation de la silanisation du PDMS. La silanisation du PDMS a été testée en mesurant la tension surfacique par étude de mouillage (Tableau 2).

Les résultats (tableau 4) nous montrent que l'angle de contact moyen d'une surface de PDMS non traité est de 113,97°. L'angle de contact est plus faible lorsque la surface est trempée à température ambiante (25°C) (moyenne des moyennes=108,34°) et il est plus élevé lorsque la surface est trempée à 80°C (moyenne des moyennes=116,43°).



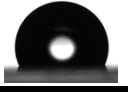
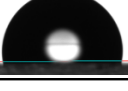
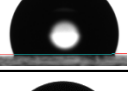
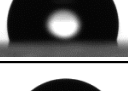
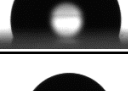
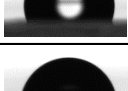
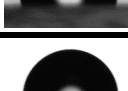

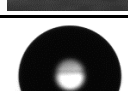
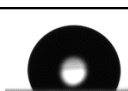
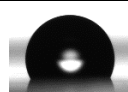
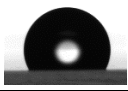
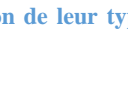
N°	Traitement PFDTS	T° (°C)	tincubation (h)	CAM (°)		Image d'une goutte
				Moyenne	Ecart-type	
0	Non	-	-	113,972	1,24540249	
1	Oui	25	1	103,990909	6,60275163	
2	Oui	25	2	108,928	3,71348534	
3	Oui	25	3	110,117	1,79377968	
4	Oui	25	4	110,28	1,42574737	
5	Oui	25	5	110,627	0,76698617	
6	Oui	25	6	106,108	3,34754902	
7	Oui	80	1	115,503	0,87537992	
8	Oui	80	2	116,589	1,33856847	
9	Oui	80	3	117,07	0,86335264	
10	Oui	80	4	117,714	1,15267033	
11	Oui	80	5	117,217	0,92431416	
12	Oui	80	6	114,489	1,80467572	

Tableau 4. Résultats de l'étude de mouillage de la surface de PDMS fonctionnalisé au PFDTS en fonction de leur type de traitement. l'ensemble des résultats peuvent être retrouvés en Annexe 4.

Un micro tamponnage a été effectué avec l'encre fluorescente orange sur chacune des surfaces silanisées. Les résultats sont identiques, on aperçoit un micro tamponnage avec une très bonne résolution. (Figure 32-33)

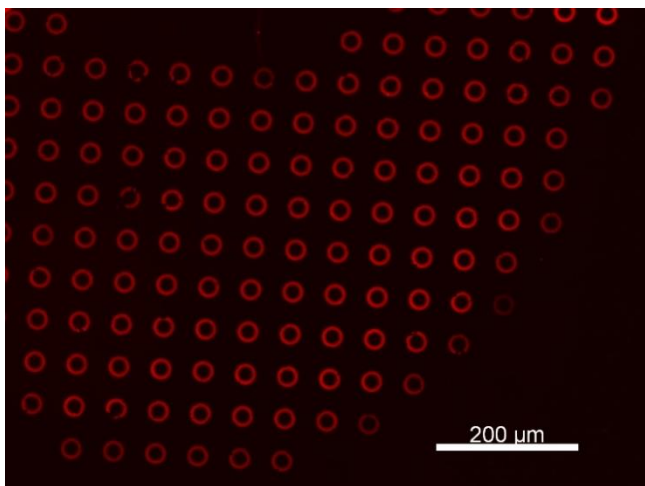


Figure 34. Images microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement par silanisation avec le PFDTs de surface à 25°C pendant 1h.

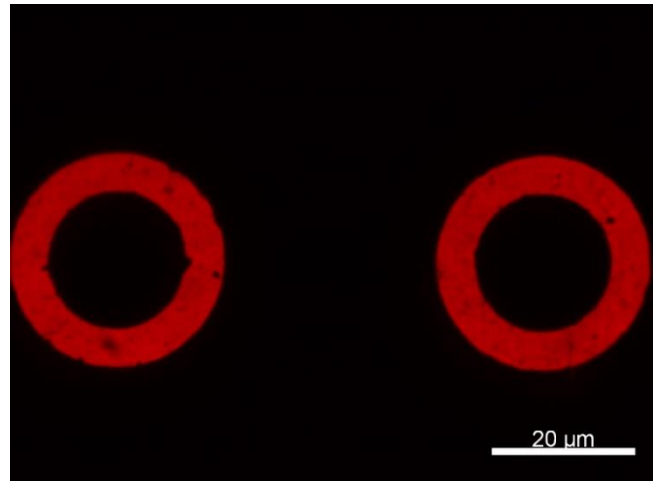


Figure 33. Images microscopique (x1000) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement de surface par silanisation avec le PFDTs à 80°C pendant 6h.

Ces résultats montrent qu'il y a bien eu un traitement de surface, cependant il n'a pas été identique entre les deux méthodes de traitement.

Une observation a été faite lors de ces expériences. En effet, certaines impressions avec une hauteur de tamponnage trop élevée sur le PDMS silanisé nous montrent un tamponnage négatif alors que nous utilisons un tampon positif (Figure 34).

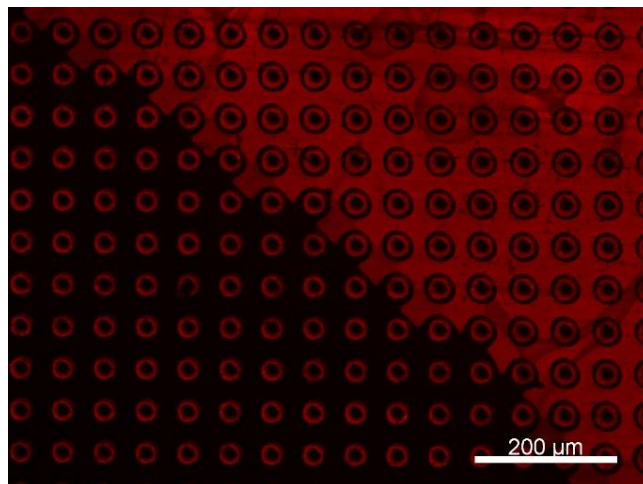


Figure 35. Images microscopique (x100) d'un tamponnage sur PDMS avec traitement de surface, hauteur de tamponnage trop élevée.

Ce phénomène s'explique par la déformation du tampon et la formation d'un collage entre les motifs. Ce type de déformation s'observe uniquement sur les bords de l'impression. Ceci est dû à la

forme du tampon. En effet, la résistance à la pression de tamponnage est plus élevée sur les côtés du fait de la forme de la membrane du tampon. (Figure 35)

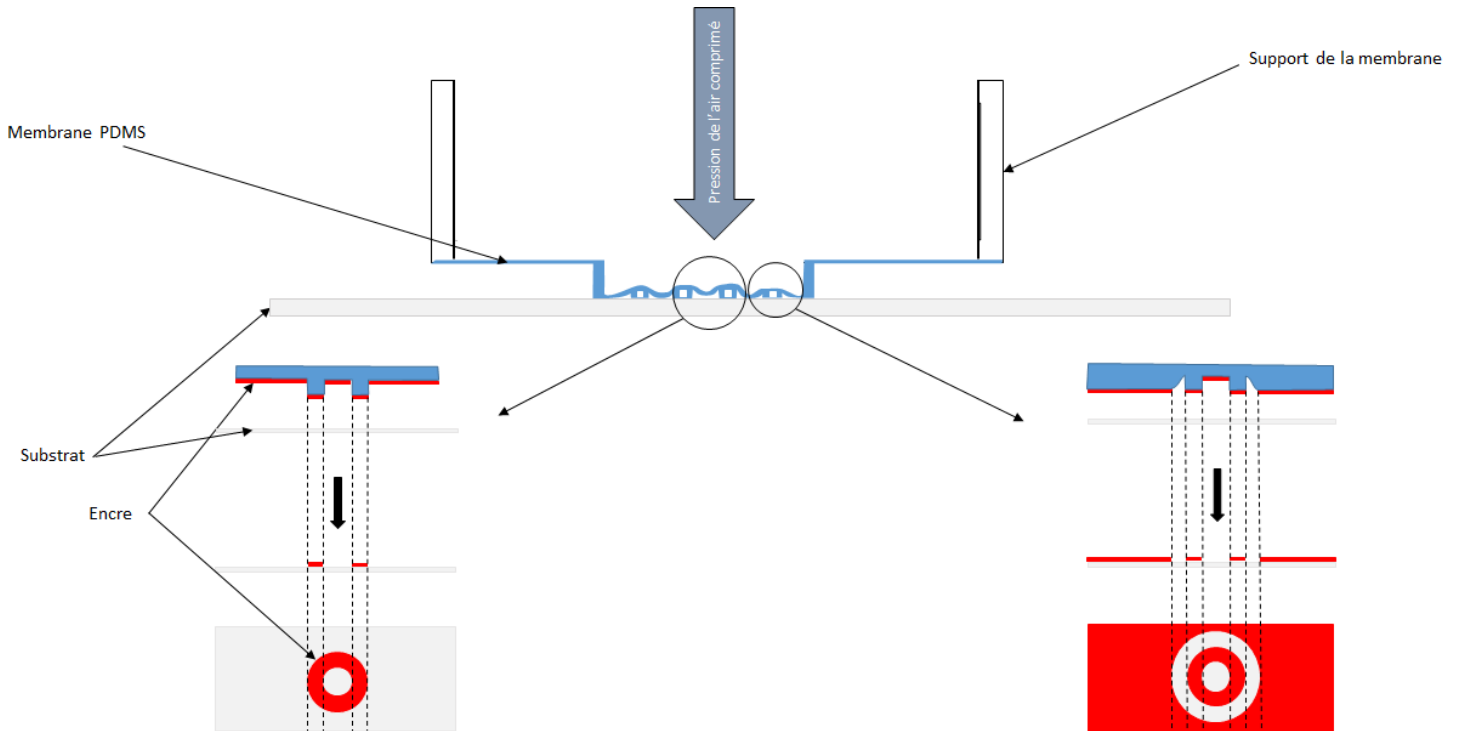


Figure 36. Schéma explicatif du phénomène de formation d'une impression négative avec un tampon positif.

### III.4. $\mu$ CP du TESUD et biofonctionnalisation du PDMS

Les résultats obtenus par observation au microscope à fluorescence (Figure 36-37) montrent des cercles bien définis. La fluorescence observée a les mêmes dimensions que les cercles du tampon. Le TESUD a donc bien été  $\mu$ CP sur le PDMS activé et l'anticorps a bien réagi avec la fonction aldéhyde du TESUD.

Ces résultats nous permettent à la fois de conclure sur :

- Le  $\mu$ CP du TESUD sur PDMS activé,
- La silanisation du TESUD avec le PDMS activé,

- La réaction d'imination entre l'anticorps secondaire et l'aldéhyde du TESUD

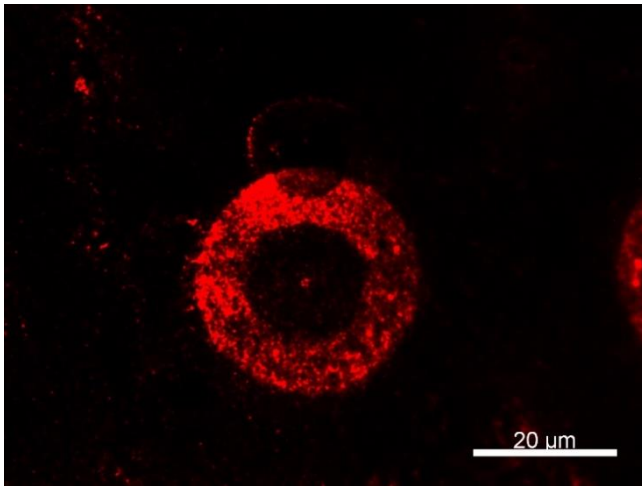


Figure 38. Image par microscopie à fluorescence (x1000) d'un cercle de TESUD tamponné sur le PDMS activé après réaction avec un anticorps secondaire fluorescent.

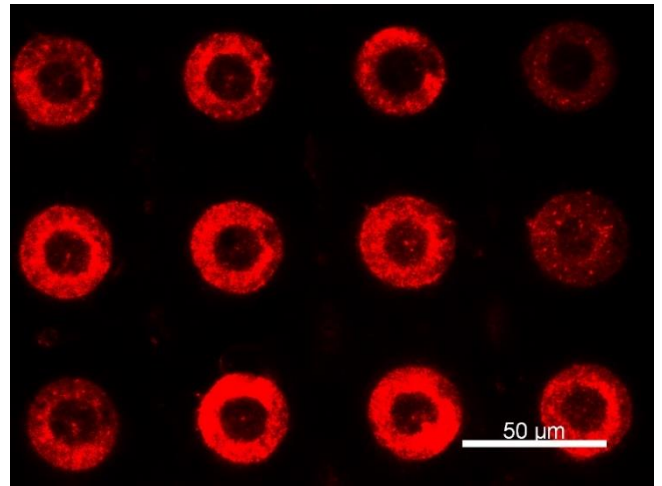


Figure 37. Image par microscopie à fluorescence (x400) d'un cercle de TESUD tamponné sur le PDMS activé après réaction avec un anticorps secondaire fluorescent.

### III.5. Détection du TNF- $\alpha$ par le biocapteur

Dans un premiers temps les analyses du TNF- $\alpha$  ont été effectuées dans un milieu aqueux tamponné à pH=9 avec une concentration élevée (50 $\mu$ g/ml) d'analytes pour valider la création du biocapteur et voir si le complexe immunitaire pouvait être formé et détecté par l'anticorps secondaire. Les résultats de cette étude (Figure 38-39) ont été suffisamment significatifs pour pouvoir continuer le projet.

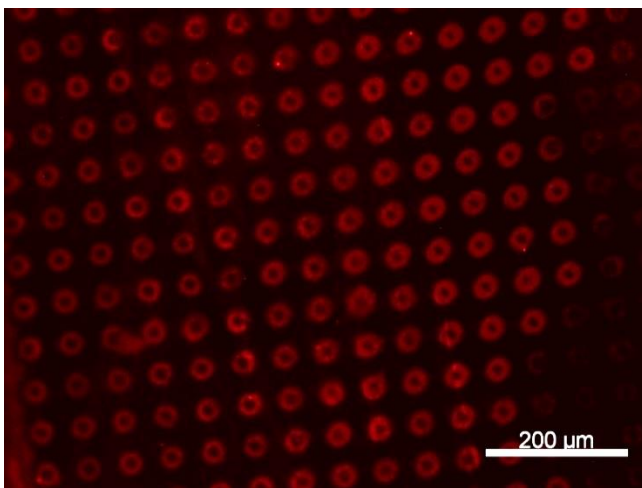


Figure 40. Image par microscopie à fluorescence (x100) d'un cercle biofonctionnalisé après interaction avec la solution de TNF $\alpha$  puis anticorps secondaire (« sandwich »)

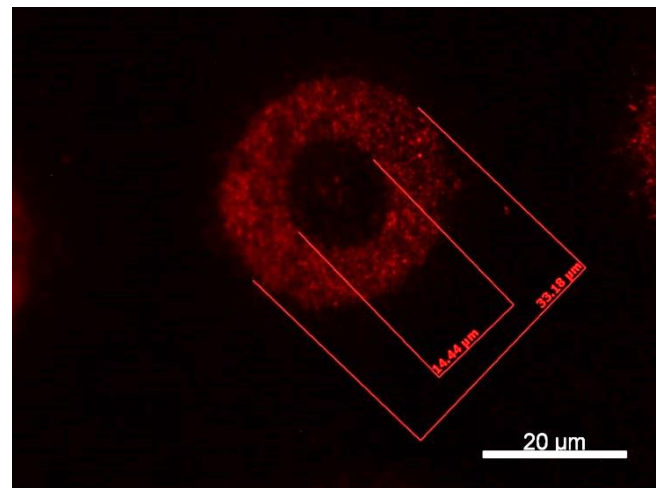


Figure 39. Image par microscopie à fluorescence (x1000) d'un cercle biofonctionnalisé après interaction avec la solution de TNF $\alpha$  puis anticorps secondaire (« sandwich »)

## Conclusion

L'objectif de ces travaux, dans le cadre de ma thèse d'exercice de pharmacie au sein de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon, était l'élaboration d'un procédé et la fabrication d'un biocapteur souple basé sur la détection optique de TNF- $\alpha$  dans la salive pour le dépistage de l'insuffisance cardiaque. Ce dispositif doit répondre à une problématique simple, être un biocapteur permettant une reconnaissance biologique spécifique et donner un résultat binaire quant à la nécessité de faire des analyses complémentaires pour un patient à risque.

Les travaux se sont articulés en quatre axes. Tout d'abord, un état de l'art sur le principe de fonctionnement des différents types de biocapteurs couramment utilisés et sur le  $\mu$ CP, une technique de biofonctionnalisation de surface. Dans un second volet, la préparation du substrat souple en PDMS activé pour le tamponnage par microcontact de SAMS de TESUD permettant une fonctionnalisation de précision de la surface du substrat par une réaction de silanisation. Dans un troisième volet, la notion de reconnaissance spécifique d'entités biologiques a été abordée et plus particulièrement ont été présentés les résultats de greffage d'anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$  sur les surfaces prédéfinies par le  $\mu$ CP. Enfin la dernière partie de cette étude a été axée sur la détection du TNF- $\alpha$ .

**Dans le premier axe**, les capteurs couramment utilisés pour la détection de biomolécules ainsi que leurs performances sont exposés. Nous avons pu voir que l'élaboration de biocapteurs spécifiques pour de la reconnaissance biologique nécessite une bio-fonctionnalisation de surface efficace ce qui nous a mené au choix de la technique de l'impression par microcontact pour ses qualités intrinsèques de reproductibilité, de précision et de coût réduit.

**Dans le deuxième axe**, dans le cadre de la fabrication d'un biocapteur en PDMS, nous avons développé l'étape essentielle qui consiste à préparer chimiquement la surface de détection. Afin de greffer des entités biologiques sur le silicium sans dénaturer les protéines, nous avons greffé un composé organosilane à la surface du matériau sous forme de couche auto-assemblée, afin de lier de manière covalente les biomolécules sur le support solide du biocapteur. Nous avons réalisé une étude complète de fonctionnalisation en utilisant le TESUD. La réaction de silanisation à température ambiante, mettant en jeu l'organosilane solubilisé dans l'éthanol, a été étudiée sur des substrats de PDMS activés par plasma oxygène. Par ailleurs, la durée de silanisation a été optimisée à 90°C pendant 1h.

Afin de répondre à la problématique d'un biocapteur fonctionnalisé par  $\mu$ CP, les différents paramètres de la  $\mu$ CP ont également été étudiés et optimisés afin d'avoir un dépôt précis et homogène de TESUD pour la formation de SAMs sur le substrat conforme aux motifs du tampon. Les résultats ont été analysés par microscopie à fluorescence à l'aide d'un anticorps munis d'un chromophore.

**Dans le troisième axe**, la notion de greffage protéinique sur SAMS a été abordée. Dans le cadre de la fabrication d'un biocapteur pour la détection de biomarqueurs spécifiques de l'insuffisance cardiaque (TNF- $\alpha$ ) basée sur le greffage de protéines sur des surfaces de PDMS fonctionnalisées a été développée. Dans un souci de spécificité d'analyse du TNF- $\alpha$  les anticorps greffés ont été les anticorps monoclonaux anti-TNF- $\alpha$ . Le greffage protéinique sur les SAMS de TESUD a été effectué par imination de l'aldéhyde du TESUD et de l'amine primaire de l'anticorps, suivie d'une réduction par hydrure. Cette réduction a été faite dans un souci de stabilité de greffage de notre couche bio reconnaissante sur le support en PDMS.

**Dans le dernier axe**, une étude de la fonctionnalité de notre biocapteur a été effectuée. Ce dernier est basé sur la reconnaissance du complexe immunitaire entre l'anticorps spécifique anti-TNF- $\alpha$  et le TNF- $\alpha$  par un anticorps secondaire doté d'un chromophore (Rhodamine). L'analyse est ensuite effectuée par microscopie à fluorescence. Cette technique permet d'avoir un visuel sur la reconnaissance de notre complexe. Ce dernier axe est actuellement en cours de finalisation. En effet, les tests de détection du TNF- $\alpha$  ont été effectués dans un milieu aqueux à pH biologique (pH=7,2) pour favoriser les interactions biologiques anticorps/antigène.

Pour conclure, ce travail se termine avec la finalisation de la création d'un biocapteur pour le TNF- $\alpha$ . L'innovation mise en avant lors de ce travail a été la biofonctionnalisation du PDMS par  $\mu$ CP, ce qui n'avait pas encore été publié. La suite du projet, notamment les tests finaux sur la détection en milieu salivaire dans les gammes de concentrations adéquates n'ont pas eu le temps d'aboutir. Il aura néanmoins permis de progresser dans tous les axes d'étude. En effet, les conditions de fonctionnalisation chimique et biologique ont été optimisées. De plus, le procédé d'optimisation du  $\mu$ CP a été défini. Ces travaux ont d'ailleurs mené à l'écriture d'un article scientifique, actuellement en cours de correction.

Concernant les perspectives pour ces travaux, la première d'entre elles est de réaliser des tests négatifs sur la détection du TNF- $\alpha$  par notre biocapteur afin de valider sa sélectivité. Ensuite des tests dans la matrice salivaire devront être effectués et un protocole de traitement pré-analytique devra être mis en place. La technique de  $\mu$ CP a de nombreux avantages et l'on peut également

penser à un biocapteur permettant la détection de cytokines multiples par impression de différents anticorps ou SAMs sur une même surface permettant une analyse multiple en une seule manipulation afin d'affiner le diagnostic.

La mise en place d'un tel dispositif de dépistage rapide de l'insuffisance cardiaque pourrait être un véritable avantage pour le domaine médical. En effet, le micro tamponnage de molécules sur surfaces est actuellement un processus réservé à la recherche. Cependant on peut facilement penser à une évolution industrielle. A un niveau industriel le micro tamponnage pourrait réduire les coûts de fabrication de la biofonctionnalisation de surface. Ainsi des dispositifs tels que celui décrit dans cette thèse pourrait permettre un dépistage rapide et peu couteux de l'insuffisance cardiaque.

**Le Président de la thèse,**

Nom :

C. Vinciguerra

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **31 JAN. 2017**  
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



**Professeure C. VINCIGUERRA**

## Références

1. Cowie MR. Annotated references in epidemiology. *Eur J Heart Fail.* 2000;1(1):101–7.
2. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, et al. Chronic Heart Failure. *Circulation.* 2000;102:3060–7.
3. Miller CS, Foley JD. I, Floriano PN. Utility of Salivary Biomarkers for Demonstrating Acute Myocardial Infarction. 2014;93(7):72–9. Available from: [http://apps.isiknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=2DeQumS5CYdEmJYm8g8&page=1&doc=1](http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=2DeQumS5CYdEmJYm8g8&page=1&doc=1)
4. Crowther JR. The ELISA guidebook. Vol. 149, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2000. III-IV, 1-413.
5. Prix d'un Kit ELISA [Internet]. Available from: <http://www.anticorps-enligne.fr/search.php#opl9>
6. Syshchik O, Skryshevsky VA, Soldatkin OO, Soldatkin AP. Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2015;66:89–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.075>
7. Cornell B a, Braach-Maksvytis VL, King LG, Osman PD, Raguse B, Wieczorek L, et al. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* [Internet]. 1997;387(6633):580–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177344>
8. Liu Y, Zhang W, Yu X, Zhang H, Zhao R, Shangguan D, et al. Quartz crystal biosensor for real-time kinetic analysis of interaction between human TNF- $\alpha$  and monoclonal antibodies. *Sensors Actuators, B Chem.* 2004;99(2–3):416–24.
9. Baraket A, Lee M, Zine N, Yaakoubi N, Trivella MG, Zabala M, et al. Cytokine detection using diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates with integrated AG/AGCL reference electrode. In: *Procedia Engineering.* 2012.
10. E. Prats-Alfonso , X. Sisquella , N. Zine , G. Gabriel , A. Guimerà , F. Javier del Campo , R. Villa , A. H. Eisenberg , M. Mrksich , A. Errachid , J. Aguiló FA. cancer prognostics by direct detection of p53-antibodies on gold surfaces by impedance measurements. *Small.* 2012;1–10.
11. Brunet S, Thierry D, Brand D, Leclerc M, Benyelles L, Costa C Da, et al. PRÉVALENCES ET STATUT FONCTIONNEL DES CARDIOPATHIES ISCHÉMIQUES ET DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE DANS LA POPULATION ADULTE EN FRANCE : APPORTS DES ENQUÊTES DÉCLARATIVES « HANDICAP-SANTÉ ». 2015;200(221):152–61.
12. T. Saudubray a C. Saudubray b CV a GJ c A-JV a AF a TH a d \*. Prevalence et prise en charge de l'insuffisance cardiaque en France : enquete nationale aupres des medecins generalistes du reseau Sentinelles. *La Rev Med interne* 26 845-850. 2005;26:845–50.
13. Gabet A, Lamarche-vadel A, Chin F. Mortalité due à l'insuffisance cardiaque cardiaque en France, évolutions 2000-2010. *BEH, InVS.* 2014;5–13.
14. Komajda M, Forette F, Berrut G, Emeriau P, Friocourt P, Galinier M, et al. Recommandations



- pour le diagnostic et la prise en charge de l'insuffisance cardiaque du sujet âgé. 2004;803–22.
15. Rockwood K. Acute confusion in elderly medical patients. *J Am Geriatr Soc.* 1989;37(2):150–4.
  16. Tresch DD. CONGESTIVE HEART FAILURE IN OLDER PATIENTS: The Clinical Diagnosis of Heart Failure in Older Patients. *J Am Geriatr Soc.* 1997;45(9):1128–33.
  17. McMurray JJ V, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(8):803–69.
  18. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2005;95(11 SUPPL. 1):3–8.
  19. Laviolle B, Bellissant E. Les antagonistes du TNF $\alpha$  dans l'insuffisance cardiaque. 2006;20(figure 1).
  20. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201–6.
  21. Guillermo Torre-Amione, MD, PhD; Samir Kapadia, MD; Joseph Lee, MD; Jean-Bernard Durand, MD; Roger D. Bies, MD; James B. Young, MD; Douglas L. Mann M. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor Receptors in the Failing Human Heart. *Am Hear Assoc [Internet].* 1996; Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/93/4/704.long>
  22. Anthony FS, Robert EF, Margaret MP, Brenner M, Joseph AK, Robert AW, et al. The Cardiovascular Response of Normal Humans to the Administration of Endotoxin. *N Engl J Med [Internet].* 1989;321(5):280–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198908033210503>
  23. Guillermo Torre-Amione, MD, PhD; Samir Kapadia, MD; Joseph Lee, MD; Roger D. Bies, MD; Russel Lebovitz, MD, PhD; Douglas L. Mann M. Expression and Functional Significance of Tumor Necrosis Factor Receptors in Human Myocardium. *Am Hear Assoc [Internet].* 1995; Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/92/6/1487.long>
  24. Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick RK. Comparison of Biomarkers in Blood and Saliva in Healthy Adults. *Nurs Res Pract [Internet].* 2012;2012:1–4. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/nrp/2012/246178/>
  25. Khozayemeh F, Mortazavi M, Khalighinejad N, Akhavankhaleghi M AM. Salivary levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients undergoing hemodialysis. *Dent Res J (Isfahan).* 2016;13(1):69–73.
  26. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF- $\kappa$ B dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(1):42–5.
  27. Assareh A, Haybar H, Yoosefi H, Bozorgmanesh M. Bedside-friendly prediction for presence of post-myocardial infarction systolic dysfunction using multimarker panel: Integrating salivary diagnostics into clinical practice. *Korean Circ J.* 2013;43(4):246–54.

28. Godin M, Williams PJ, Tabard-Cossa V, Laroche O, Beaulieu LY, Lennox RB, et al. Surface stress, kinetics, and structure of alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2004;20(17):7090–6.
29. Girault HH. *Electrochimie physique et analytique* [Internet]. Presses polytechniques et universitaires romandes; 2007. (Cahiers de chimie). Available from: [https://books.google.fr/books?id=kr\\_34MuuprgC](https://books.google.fr/books?id=kr_34MuuprgC)
30. Merwe PAV Der. Surface plasmon resonance in Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. Oxford Univ Press [Internet]. 2001;137–70. Available from: [http://agure.bilkent.edu.tr/13 Surface Plasmon Resonance - general info..pdf](http://agure.bilkent.edu.tr/13%20Surface%20Plasmon%20Resonance%20-%20general%20info..pdf)
31. Mrksich M, Whitesides GM. Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: A new technology for biosensors? *Trends in Biotechnology*. 1995.
32. Wallraff GM, Hinsberg WD. Lithographic Imaging Techniques for the Formation of Nanoscopic Features. *Chem Rev* [Internet]. 1999;99(7):1801–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849011>
33. Bain CD, Troughton EB, Tao YT, Evall J, Whitesides GM, Nuzzo RG. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1989;111(1):321–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ja00183a049>
34. Kumar A, Biebuyck H a, Abbott NL, Whitesides GM. The use of self-assembled monolayers and a selective etch to generate patterned gold features. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1992;114(23):9188–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00049a061>
35. Carlson A, Bowen AM, Huang Y, Nuzzo RG, Rogers JA. Transfer printing techniques for materials assembly and micro/nanodevice fabrication. *Advanced Materials*. 2012.
36. Delamarche E, Geissler M, Wolf H, Michel B. Positive microcontact printing. *J Am Chem Soc*. 2002;124(15):3834–5.
37. Graham DJ, Price DD, Ratner BD. Solution assembled and microcontact printed monolayers of dodecanethiol on gold: A multivariate exploration of chemistry and contamination. *Langmuir*. 2002;18(5):1518–27.
38. Clarson SJ, Semlyen JA. *Siloxane polymers*. Prentice Hall; 1993.
39. Xia Y, Whitesides GM. *Soft lithography*. 1998;(12).
40. Delamarche E, Schmid H, Michel B, Biebuyck H. Stability of molded polydimethylsiloxane microstructures. *Adv Mater*. 1997;9(9):741–6.
41. Wiggenius JA, Hamedi M, Inganäs O. Limits to nanopatterning of fluids on surfaces in soft lithography. *Adv Funct Mater*. 2008;18(17):2563–71.
42. Ouyang M, Yuan C, Muisener RJ, Boulares a, Koberstein JT. Conversion of Some Siloxane Polymers to Silicon Oxide by UV / Ozone Photochemical Processes. *Chem Vap Depos*. 2000;(29):1591–6.
43. Ravoo TK and BJ. Stamps, inks and substrates polymers in microcontact printing. *Polym Chem*. 2010;1:371–87.
44. Lipomi DJ, Martinez R V., Cademartiri L, Whitesides GM. *Soft Lithographic Approaches to Nanofabrication* [Internet]. Vol. 7, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 10

Volume Set. Elsevier B.V.; 2012. 211-231 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00180-1>

45. [Http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Module\\_de\\_Young&action=history](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Module_de_Young&action=history). Module de Young [Internet]. 2016 [cited 2016 Apr 18]. Available from: [http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Module\\_de\\_Young&oldid=125273491](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Module_de_Young&oldid=125273491)
46. Michel B, Bernard A, Bietsch A, Delamarche E, Geissler M, Juncker D, et al. Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning. Vol. 45, IBM Journal of Research and Development. 2001. p. 697–719.
47. Huang YY, Zhou W, Hsia KJ, Menard E, Park JU, Rogers JA, et al. Stamp collapse in soft lithography. *Langmuir*. 2005;21(17):8058–68.
48. Pla-Roca M, Fernandez JG, Mills CA, Martinez E, Samitier J. Micro/nanopatterning of proteins via contact printing using high aspect ratio PMMA stamps and nanoimprint apparatus. *Langmuir*. 2007;23(16):8614–8.
49. Campos LM, Truong TT, Shim DE, Dimitriou MD, Shir D, Meinel I, et al. Applications of photocurable PMMS thiol-ene stamps in soft lithography. *Chem Mater*. 2009;21(21):5319–26.
50. Zhang F, Low HY. Transfer printing of 3D hierarchical gold structures using a sequentially imprinted polymer stamp. *Nanotechnology*. 2008;19:415305.
51. Svoboda M, Schrott W, Slouka Z, Pribyl M, Snita D. Plastic microfluidic systems made by imprinting against an epoxy stamp. *Microelectron Eng*. 2010;87(5–8):1527–30.
52. Truong TT, Lin R, Jeon S, Lee HH, Maria J, Gaur A, et al. Soft lithography using acryloxy perfluoropolyether composite stamps. *Langmuir*. 2007;23(5):2898–905.
53. Hu Z, Finlay JA, Chen L, Betts DE, Hillmyer MA, Callow ME, et al. Photochemically cross-linked perfluoropolyether-based elastomers: Synthesis, physical characterization, and biofouling evaluation. *Macromolecules*. 2009;42(18):6999–7007.
54. Hu Z, Chen L, Betts DE, Pandya A, Hillmyer MA, Desimone JM. Optically Transparent , Amphiphilic Networks Based on Blends of Perfluoropolyethers and Poly ( ethylene glycol )  
Optically Transparent , Amphiphilic Networks Based on Blends of Perfluoropolyethers and Poly ( ethylene glycol ). October. 2008;(14):14244–52.
55. Francois Bessueille, Mateu Pla-Roca, Christopher A. Mills, Elena Martinez, Josep Samitier AE. Submerged Microcontact Printing (S $\mu$ CP)- An Unconventional Printing Technique of Thiols Using High Aspect Ratio, Elastomeric Stamps. *Langmuir*. 2005;21:12060–3.
56. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. Vol. 105, *Chem. Rev*. 2005. 1103-1169 p.
57. Geissler M, Bietsch A, Schmid H, Michel B, Delamarche E. Microcontact-Printing Chemical Patterns with Flat Stamps. 2000;(20):6303–4.
58. Delamarche E, Schmid H, Bietsch A, Larsen NB, Rothuizen H, Michel B, et al. Transport Mechanisms of Alkanethiols during Microcontact Printing on Gold. *J Phys Chem B [Internet]*. 1998;102(18):3324–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jp980556x>

59. Szyk L, Schwinte P, Voegel JC, Schaaf P, Tinland B. Dynamical behavior of human serum albumin adsorbed on or embedded in polyelectrolyte multilayers. *J Phys Chem B*. 2002;106(23):6049–55.
60. Manandhar P, Jang J, Schatz GC, Ratner MA, Hong S. Anomalous surface diffusion in nanoscale direct deposition processes. *Phys Rev Lett*. 2003;90(March):115505.
61. Breen TL, Fryer PM, Nunes RW, Rothwell ME. Patterning Indium Tin Oxide and Indium Zinc Oxide Using Microcontact Printing and Wet Etching. *Society* [Internet]. 2002;18(24):194–7. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la015543g>
62. Libioulle L, Bietsch A, Schmid H, Michel B, Delamarche E. Contact-Inking Stamps for Microcontact Printing of Alkanethiols on Gold. *Langmuir* [Internet]. 1999;15(2):300–4. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980978y>
63. Xia Y, Whitesides GM. Extending Microcontact Printing as a Microlithographic Technique. *Langmuir* [Internet]. 1997;13(7):2059–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/la960936e>
64. Hui CY, Jagota A, Lin YY, Kramer EJ. Constraints on microcontact printing imposed by stamp deformation. *Langmuir*. 2002;18(4):1394–407.
65. Hyun J, Chilkoti A. Micropatterning biological molecules on a polymer surface using elastomeric microwells. *J Am Chem Soc*. 2001;123(28):6943–4.
66. Tan JL, Tien J, Chen CS. Microcontact printing of proteins on mixed self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2002;18(2):519–23.
67. Liebau M, Huskens J, Reinhoudt DN. Microcontact printing with heavyweight inks. *Adv Funtional Mater*. 2001;11(2):147–50.
68. Wetting R. Substrate Cleaning Adhesion Promotion. 2013;0–1. Available from: [www.microchemicals.com/downloads/application\\_notes.html](http://www.microchemicals.com/downloads/application_notes.html)
69. By James L. Wilbur, Amit Kumar, Enoch Kim GMW. Microfabrication by Microcontact Printing of Self-assembled monolayers. *Adv Mater*. 1994;6:600–4.
70. Lee J, Abdeen AA, Huang TH, Kilian KA. Controlling cell geometry on substrates of variable stiffness can tune the degree of osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;
71. Shi J, Wang L, Chen Y. Microcontact printing and lithographic patterning of electrospun nanofibers. *Langmuir*. 2009;25(11):6015–8.
72. Gout S, Coulm J, Leonard D, Bessueille F. Silver localization on polyimide using microcontact printing and electroless metallization. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2014;307:716–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.108>
73. Baraket A, Zine N, Lee M, Bausells J, Jaffrezic-Renault N, Bessueille F, et al. Development of a flexible microfluidic system based on a simple and reproducible sealing process between polymers and poly(dimethylsiloxane). *Microelectron Eng* [Internet]. 2013;111:332–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mee.2013.02.059>
74. André Bernard, Jean Philippe Renault, Bruno Michel, Hans Rudolf Bosshard ED. Microcontact printing of proteins. *Adv Mater*. 2000;

75. Li X-M, Huskens J, Reinhoudt DN. Reactive self-assembled monolayers on flat and nanoparticle surfaces, and their application in soft and scanning probe lithographic nanofabrication technologies. *J Mater Chem* [Internet]. 2004;14(20):2954. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b406037g>
76. Lahiri J, Ostuni E, Whitesides GM. Patterning ligands on reactive SAMs by microcontact printing. *Langmuir*. 1999;15(6):2055–60.
77. Yan L, Zhao XM, Whitesides GM. Patterning a preformed, reactive SAM using microcontact printing. *J Am Chem Soc*. 1998;120(24):6179–80.
78. Sullivan TP, Van Poll ML, Dankers PYW, Huck WTS. Forced peptide synthesis in nanoscale confinement under elastomeric stamps. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004;43(32):4190–3.
79. Feng CL, Embrechts A, Bredebusch I, Schnekenburger J, Domschke W, Vancso GJ, et al. Reactive microcontact printing on block copolymer films: Exploiting chemistry in microcontacts for sub-micrometer patterning of biomolecules. *Adv Mater*. 2007;19(2):286–90.
80. Feng CL, Vancso GJ, Schönherr H. Reactive microCP on ultrathin block copolymer films: investigation of the microCP mechanism and application to sub-microm (bio)molecular patterning. *Langmuir* [Internet]. 2007;23(3):1131–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241023>
81. Bodas D, Khan-Malek C. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation. *Sensors Actuators, B Chem*. 2007;123(1):368–73.
82. Patolsky F, Zheng G, Lieber CM. Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1711–24.
83. Shao G, Wu J, Cai Z, Wang W. Fabrication of elastomeric high-aspect-ratio microstructures using polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique. *Sensors Actuators, A Phys* [Internet]. 2012;178:230–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sna.2012.01.034>
84. YOKOYAMA K. Principle of Biosensor [Internet]. 2000 [cited 2016 Apr 29]. Available from: <http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>
85. Sabban S. Surface Plasmon Resonance (SPR) configuration [Internet]. 2011 [cited 2016 Apr 27]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File%253ASurface\\_Plasmon\\_Resonance\\_\(SPR\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File%253ASurface_Plasmon_Resonance_(SPR).jpg)
86. Andras Perl DNR and JH. Microcontact Printing - Limitations and Achievements. *Adv Mater*. 2009;2257–2268.
87. Jesse. Chemical structure of Polydimethylsiloxane (PDMS) [Internet]. 2006 [cited 2016 Apr 18]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%253APdms.png>
88. Susan L. Brandow, Terence L. Schull, Brett D. Martin, Daniel C. Guerin, Dressick WJ. Use of Low-Temperature Thermal Alkylation to Eliminate Ink Migration in Microcontact Printed Patterns. *Chem - A Eur J*. 2002;23:5363–7.

# Annexes

---

Annexe 1 : Tableau de méta-analyse des concentrations de TNF- $\alpha$  dans la salive en fonction de l'état de santé du patient avec recensement des techniques d'analyses utilisées.

Année	Auteur du journal	Problématique étudiée	Cohorte		Facteurs	Concentration TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Ecart-type (pg/ml)	Technique analytique	Sensibilité (pg/ml)	LOD (pg/ml)	Publication
			Genre	Nombre							
2015	Faezeh Khozeymeh et al.	Taux de TNF- $\alpha$ et IL-6 dans la salive chez les patients sous hémodialyse	Homme	12	Contrôle	3,62	1,19	ELISA Kits	< 1	7,8	[66]
			Femme	8							
			Homme	12	Sous hémodialyse	9,9	1,78				
			Femme	8							
2005	Nelson L. Rhodus et al.	La faisabilité de la surveillance des cytokines NF- $\kappa$ B dans la salive pour la transformation maligne de l'Oral Lichen Planus	-	3	Fumeur	5,4	3,8	ELISA	4,4	-	[76]
			-	10	Non Fumeur	2,75	0,8				
			-	10	Oral lichen planus + Fumeur	81,61	36,83				
			-	3	Oral lichen planus + Non Fumeur	48,63	39,2				
			-	10	Oral squamous cell carcinoma + Fumeur	98,99	56,02				
			-	3	Oral squamous cell carcinoma + Non Fumeur	119,13	98,8				
2013	Ahmadreza Assareh et al.	Intégrer le diagnostics des biomarqueurs salivaires dans la pratique clinique pour la présence d'infarctus du myocarde	Homme	46	Insuffisance cardiaque	48,37	36,9	ELISA Kits	1,95	7,8	[72]
			Femme	34		52,41	37,34				
			Homme	9	Insuffisance cardiaque + Fumeur	107,24	252,79				
			Femme	5							
			Homme	37	Insuffisance cardiaque + Non Fumeur	52,22	29,14				
			Femme	29							
			Homme	13	Insuffisance cardiaque + Diabète	49,01	24,56				
			Femme	20							
			Homme	9	Insuffisance cardiaque + Hyperlipidémie	51,32	24,74				
			Femme	14							
			Femme	12	Insuffisance cardiaque + Hypertension	47,81	23,76				
2004	Nelson L. Rhodus et al.	Etude de l'exercice physique sur les concentration salivaires de cortisol, TNF-alpha et de nitric oxide	Homme	10	Contrôle - Non Fumeur	4,93	0,55	ELISA	-	-	[77]
					Pendant un exercice physique de 7 min	9,49	0,69				
					Pendant un exercice physique de 14 min	14,16	0,93				
					1h après l'exercice	8,98	0,48				
					24h après l'exercice	9,49	0,69				

Tableau 5. Tableau de méta-analyse des concentrations de TNF- $\alpha$  dans la salive en fonction de l'état de santé du patient avec recensement des techniques d'analyses utilisées.

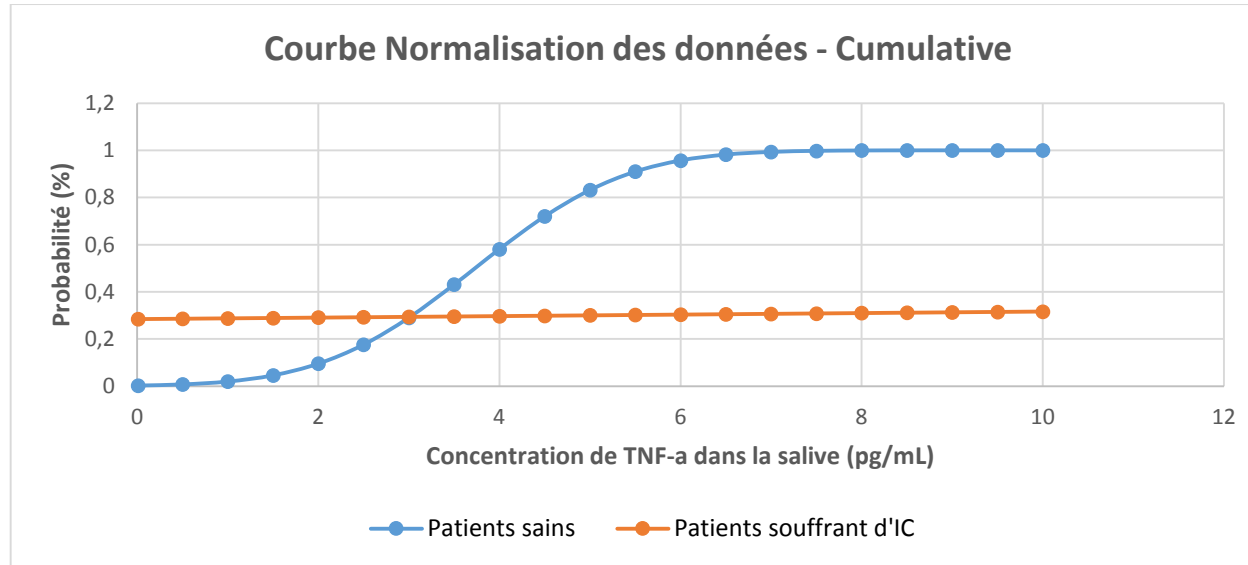
Annexe 2 : Analyses des données de l'Annexe 1 et recherche d'une valeur « cut off » de concentration en TNF- $\alpha$  pour séparer les patients sains des patients sous IC.

Patients	Moyennes	Ecart-types	Variances	n
Sains	3,62	1,19	1,4161	20
	4,93	0,55	0,3025	10
	2,75	0,8	0,64	10
IC	52,49	22,82	520,7524	34
	68,77	141,3	19965,69	46

Patients	moyenne des moyennes	Moyenne des variances	log moyenne	Variance des moyennes	Var total	Ecart-type total
Sains	3,73	0,943675	0,571708832	0,802822222	1,746497222	1,321551067
IC	61,851	11701,59152	1,791346726	66,2596	11767,85112	108,4797268



Concentration en TNF-a (pg/ml)	Loi normal cumulative - Sains	Loi normal cumulative - IC
0,01	0,002439817	0,284315229
0,5	0,007260746	0,285848952
1	0,019425835	0,28741802
1,5	0,045762161	0,288991149
2	0,095255686	0,290568318
2,5	0,175998038	0,292149502
3	0,290343595	0,293734679
3,5	0,43091783	0,295323824
4	0,580942569	0,296916914
4,5	0,71993509	0,298513925
5	0,831721904	0,300114832
5,5	0,90976923	0,301719611
6	0,957072374	0,303328236
6,5	0,981959877	0,304940684
7	0,993326341	0,306556928
7,5	0,997832582	0,308176943
8	0,999383322	0,309800704
8,5	0,999846544	0,311428184
9	0,999966647	0,313059357
9,5	0,999993675	0,314694198
10	0,999998955	0,316332679



cut off = 6pg/ml		Malade	Sain
	T+	69,66717637	4,292762646
	T-	30,33282363	95,70723735
		100	100
	Sensibilité	0,696671764	
	Spécificité	0,957072374	

## Annexe 3 : Préparation du PDMS

### *Préparation du gel de solution de PDMS*

La préparation du gel ne nécessite pas une salle blanche. Cependant la salle de préparation doit être propre avec le moins de poussière volatile possible. L'utilisation de gants est obligatoire à toutes les étapes.

Note : Le PDMS peut parfois se troubler lors de la manipulation. Il semblerait que cela provienne d'une quantité d'eau incorrecte dans le gel. Il faut donc utiliser la solution d'élastomère original et ne pas la diluer.

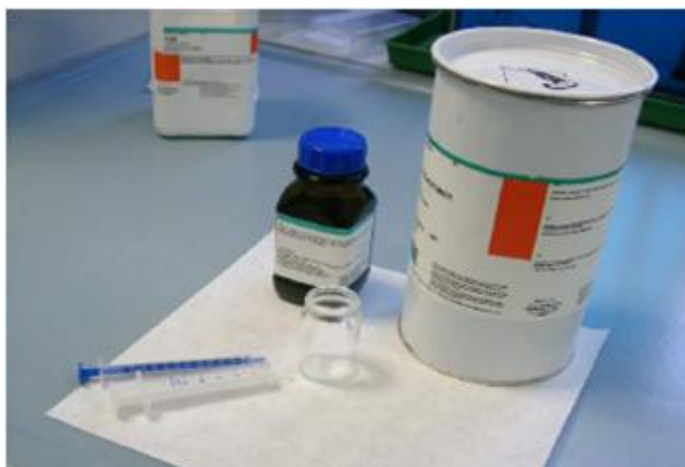


Figure 41. Matériels pour la préparation du PDMS.

1. Mesurer correctement les volumes (ou les poids) des deux composants de l'élastomère siliconé Sylgard 184 : 10 parts de base et 1 part d'agent de polymérisation. Il faut toujours utiliser un nouveau contenant pour le mélange, ainsi qu'une nouvelle seringue pour chacun des liquides.



Figure 42. Prélèvement du monomère de PDMS à l'aide d'une seringue.

2. Le mélange doit être visqueux, il doit donc être mélangé pendant au moins 2 min.



Figure 43. Agitation pour le mélange du monomère de PDMS et de son catalyseur.

3. Le mélange doit ensuite être dégazé avec un dessiccateur pendant 15-30 min sous vide et à température ambiante. (Pendant le dégazage la station de moulage peut être préparé, voir ci-dessous : 2.2 Préparation et assemblage de la station de moulage)



Figure 44. Dégazage du mélange de PDMS.

4. Une fois le PDMS dégazé prélever le polymère avec une seringue sans faire de bulles d'air. Le polymère peut être utilisé pendant 2h.



Figure 45. Prélèvement à la seringue du mélange de PDMS dégazé.

### *Préparation et assemblage de la station de moulage*

Cette phase peut être préparée lors du dégazage décrit ci-dessus :

1. S'assurer de la propreté du support du tampon en le lavant à l'éthanol. Il ne doit plus y avoir de résidus de PDMS.  
Un traitement optionnel peut être effectué s'il y a des problèmes de fermeture. L'intérieur du support peut être recouvert d'un agent fixant. Cet agent fixant doit s'évaporer 10 min avant de le mettre en contact avec le PDMS.



Figure 46. Nettoyage du support du tampon.

2. Placer le moule (« master ») au milieu du bloc d'aluminium.

**Attention :** Le moule doit être exactement au milieu de la cavité centrale pour ne pas être cassé pendant l'assemblage. L'orientation du moule doit être notée en cas de moule avec des motifs anisotropiques. De plus le moule est fragile. Il faut donc faire très attention lorsque l'on veut le retirer du bloc en aluminium.

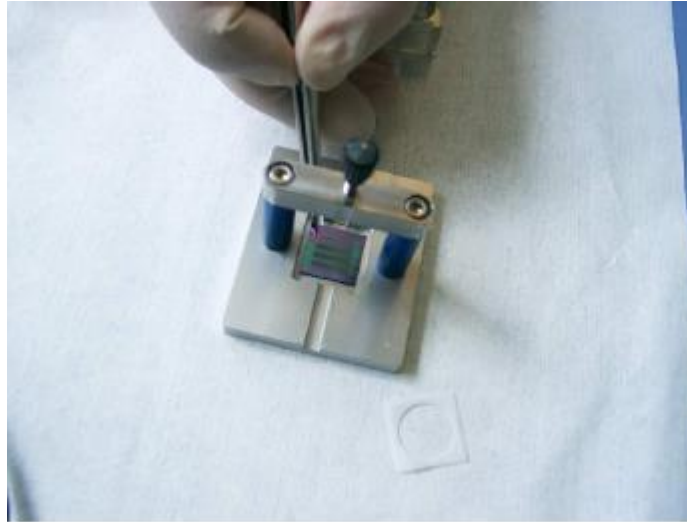


Figure 47. Déposition du moule en silicium.

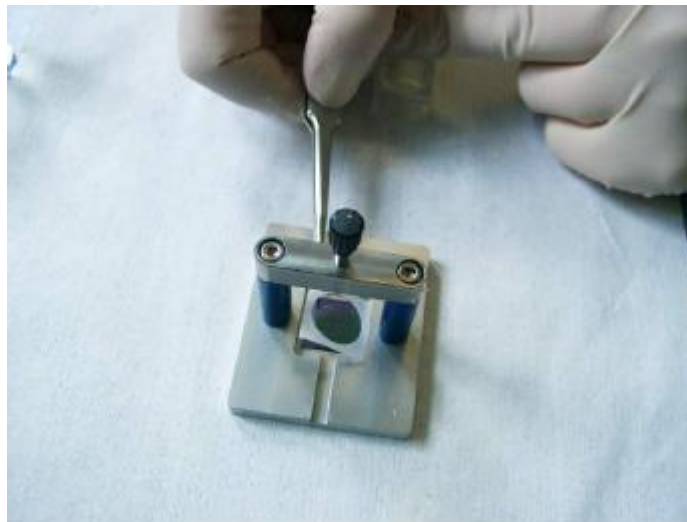


Figure 48. Insertion de la rondelle de Teflon.

3. Insérer la rondelle en Teflon.





4. Avant l'assemblage du support à tampon. Recouvrir la surface du support qui sera en contact avec le bloc en aluminium avec du PDMS dégazé, préparé au préalable.



**Figure 49. Préparation du moulage.**

5. Régler l'épaisseur du tampon en PDMS en modifiant la position du rond en PMMA dans le cylindre de polycarbonate : Support du tampon. Puis positionner le support du tampon sur le bloc en aluminium.



**Figure 50. Pose du support du tampon sur le bloc en aluminium**

6. Régler la vise au-dessus du support.

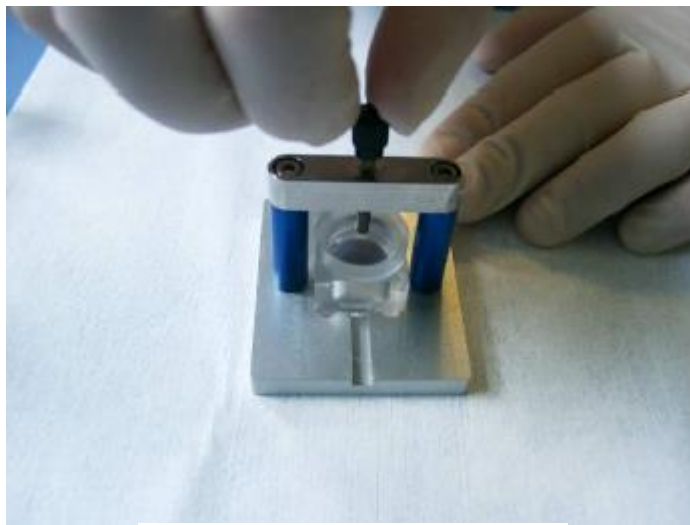


Figure 51. Réglage de la vise du support

### *Mouler et démouler le tampon de PDMS*

1. Injecter la solution de PDMS à l'aide d'une seringue par un des trous sur le côté. (N'injecter pas de bulles). Arrêter l'injection lorsque la solution ressort par le trou opposé.  
La réticulation du PDMS se fait dans un four à 65°C pendant 4h. Il peut être accéléré avec un four à 100°C pendant 1h.

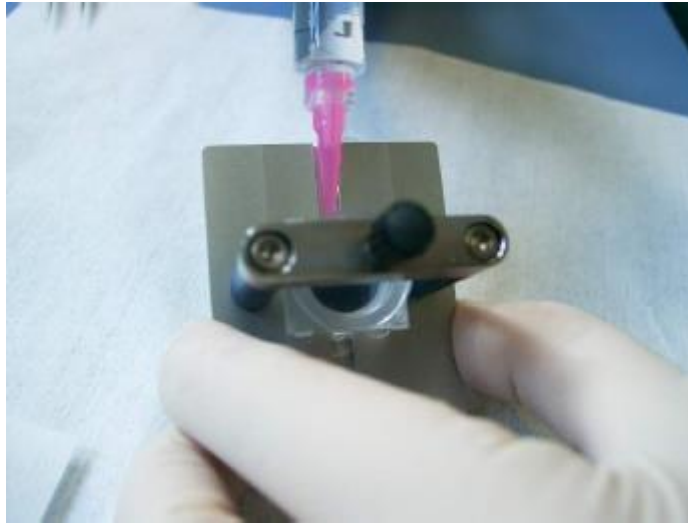


Figure 52. Injection du PDMS dans le trou du support de tampon.

- Sortir tout le dispositif du four (Attention à la chaleur) et laisser refroidir à température ambiante. Puis retirer au scalpel les surplus de PDMS au niveau des trous latéraux d'injection et de sortie.

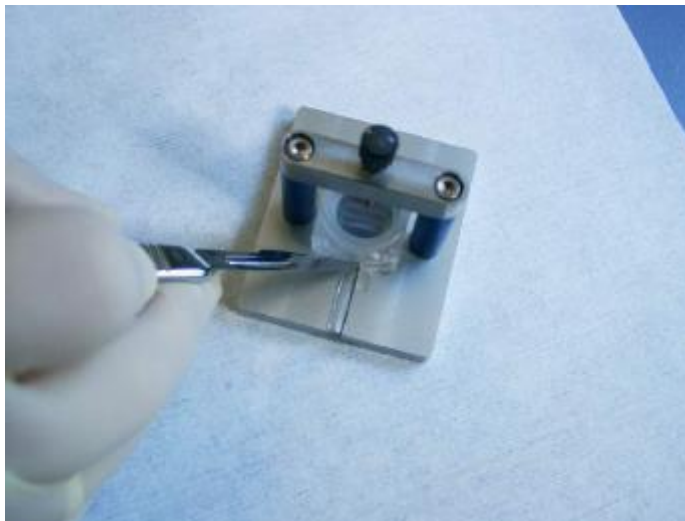


Figure 53. Retrait du surplus de PDMS sur les bords du tampon au scalpel.

- Dévisser la visse et retirer délicatement le support du tampon avec le tampon en PDMS et le moule du bloc d'aluminium.  
Note : Si le moule ne part pas du bloc en aluminium. Ne pas forcer et le laisser en place.

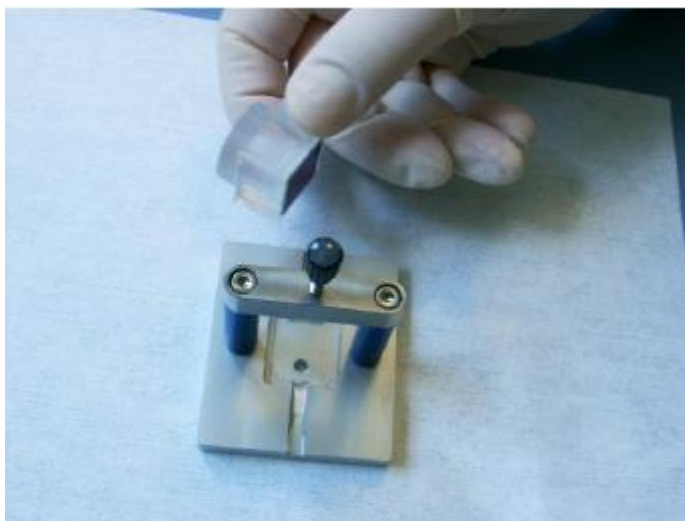


Figure 54. Retrait du tampon du bloc en aluminium.

- Retirer délicatement le moule du tampon.

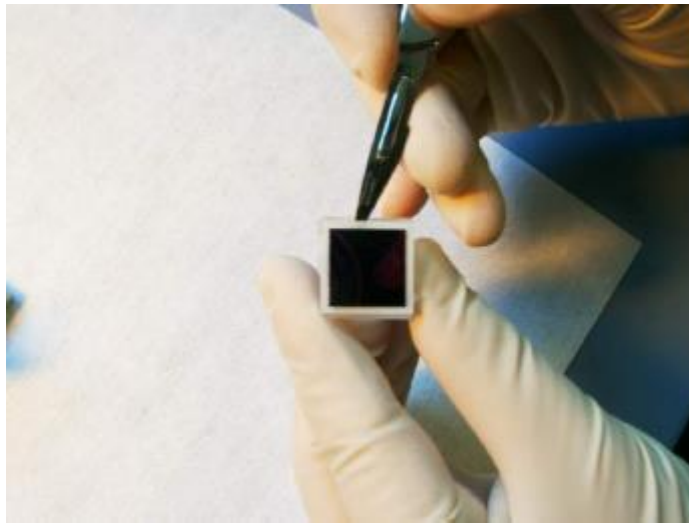


Figure 55. Retirer le moule en silicium du tampon.

- Recouvrir le tampon de scotch afin de protéger celui-ci lorsqu'il n'est pas utilisé. Pousser le piston doucement afin de faire sortir de quelques millimètres le tampon.

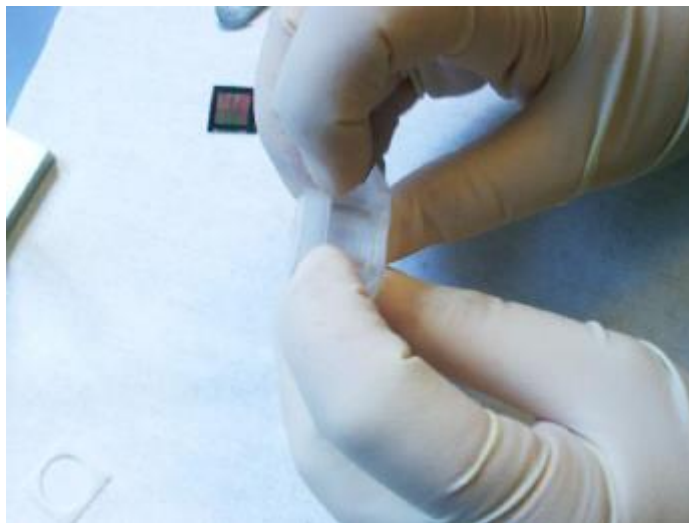


Figure 56. Protection du tampon avec un ruban adhésif.

6. Retirer doucement le piston.



**Figure 57. Retirer le piston.**

## Présentation de l'imprimante à microcontact

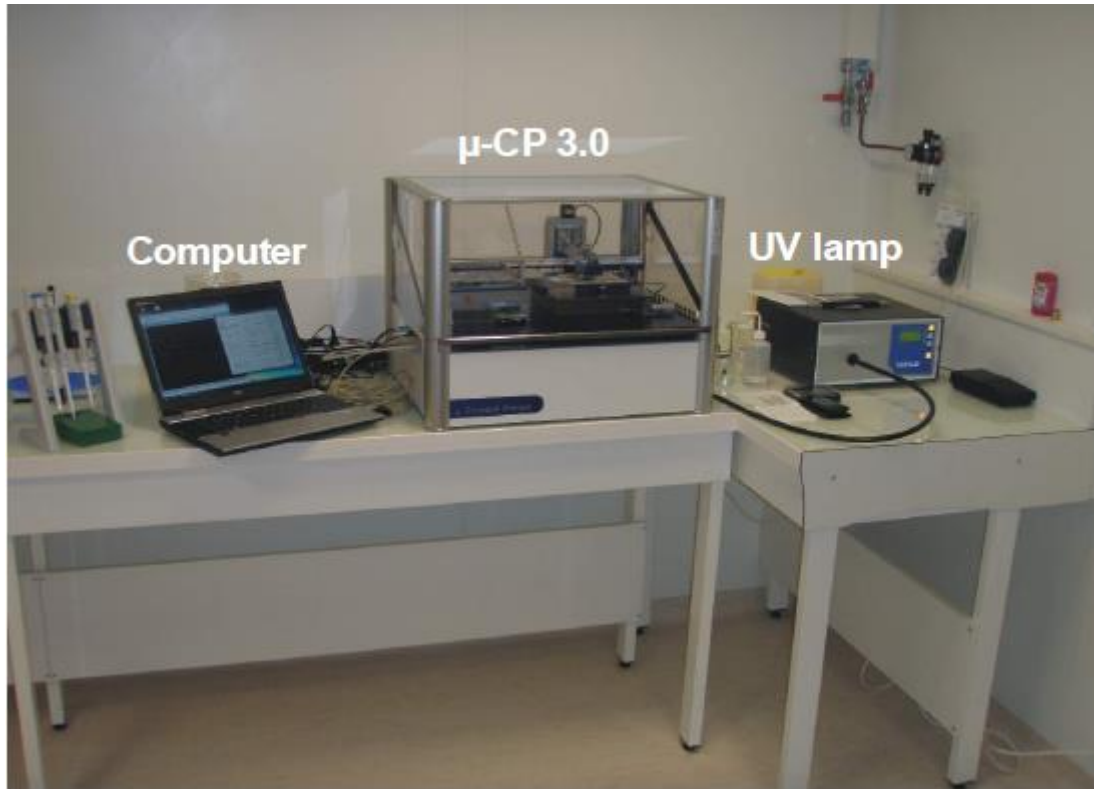


Figure 58. Imprimante et outils annexes

Pour la mise sous tension de l'imprimante,

- Bien vérifier que chacune des machines annexes soient bien reliées à l'imprimante microcontact (ici «  $\mu$ CP 3.0 »). Le logiciel sur l'ordinateur (ici « computer ») permettant le contrôle de l'imprimante sera présenté dans une partie ultérieure. De plus une arrivée d'air comprimé est nécessaire, attention ne pas utiliser d'oxygène sous pression.
- Dans un premiers temps allumer le boîtier noir entre l'ordinateur et l'imprimante (le ventilateur devrait se mettre en route produisant un son caractéristique, si ce n'est pas le cas alors l'imprimante n'est pas branché sur le réseau principale)
- Puis allumer l'imprimante avec le bouton côté gauche de l'imprimante.

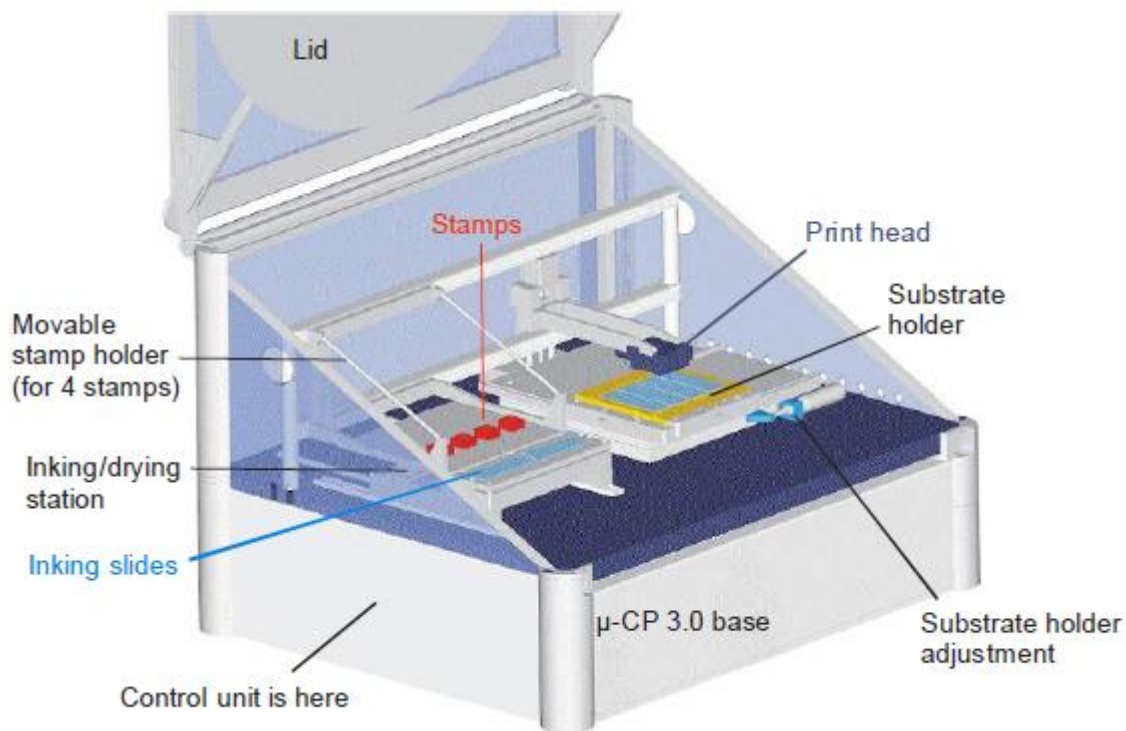


Figure 59. Schéma basic de l'imprimante µCP

Présentation en détails de l'imprimante µCP :

- Un porte-tampon (= « Movable stamp holder ») qui peut transporter jusqu'à quatre timbres; ceux-ci sont constitués d'une monture de tampon de polycarbonate. Le porte-tampon peut être déplacé entre la station d'encre/séchage et la tête d'impression. Pour ce faire, vous devez soulever la poignée de cuivre dans le coin gauche à l'arrière.
- Une station d'encre (= « Inking/drying station ») pour maintenir les lamelles sur lesquelles la solution d'encre est introduit à la pipette. Pour encrer les tampons, faites glisser le porte-tampon à la position la plus à gauche de sorte que les timbres soient au-dessus de la table d'encre/séchage, puis appuyez doucement sur la table d'encre/séchage vers l'arrière jusqu'à ce que les lamelles d'encre soient en dessous des tampons. Le mouvement des lamelles pour l'encre est contrôlé par le logiciel.

Note : L'encre peut également être effectué manuellement en dehors de l'enceinte de l'imprimante puis apporté pour ne se servir que de la fonction impression.

- La station de encre/séchage (= « drying station ») peut également sécher les lamelles avec de l'air comprimé. Pour ce faire, tirer la table d'encre/séchage en avant de sorte que les tampons soient au-dessus des buses. Activez ensuite le séchage dans le logiciel. Un papier buvard veille permet les déversements.
- Un support de substrat (= « Substrate holder ») sur laquelle différents substrats peuvent être monté. La table peut être chauffée, si elle est utilisée pour NIL. La position du support peut être ajusté, soit grossièrement en



tirant ou poussant la table (certaines positions d'arrêt sont définies par des encoches) ou par petits incréments en tournant les boutons sur les trois disques vernier en X, Y, et  $\phi$ .

- Une tête d'impression (= « Print head ») sur lequel un tampon est fixé et qui peut se déplacer vers le haut et vers le bas (en Z direction). Un tube est branché sur la buse à la tête d'impression afin que le timbre de PDMS puisse être gonflé par air comprimé. Le fixage du tampon sur la tête, le mouvement de la tête et le contrôle de la pression de l'air comprimé est contrôlé par le logiciel expliqué plus tard.

## Présentation du logiciel

### Interface principale

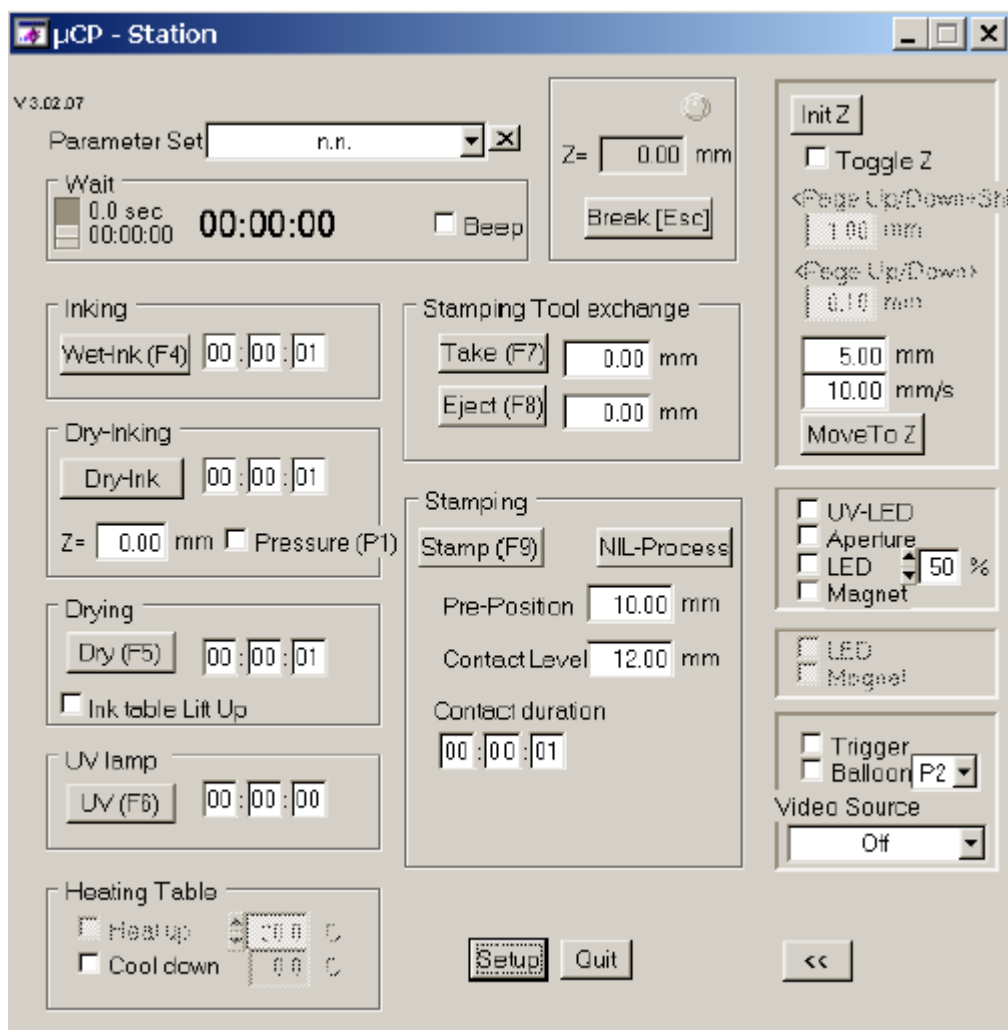


Figure 60. Capture d'écran du logiciel  $\mu$ CP avec les fonctions de base. Le panneau avec les fonctions supplémentaires est déjà affiché à droite, en marge.

- **Wait, (=Attendre) :** Ce champ en haut à gauche affiche le temps d'attente de l'étape en cours, décompter jusqu'à zéro. Vous pouvez choisir entre deux affichages différents et aussi activer un signal sonore lorsque l'étape est terminée (cocher Beep)

- **Z = :** Le champ de Z en haut à droite montre la position Z actuelle du Z-drive en millimètres. Pour régler les niveaux de la tête d'impression en hauteur il faut regarder les chiffres dans ce domaine tout en se rapprochant de la Pre-Position (= Position au-dessus de laquelle la cible est atteinte rapidement, sans contact) et le Contact-Level. Cette fonction (Contact-level) est utilisée pour l'impression. Elle représente la hauteur à laquelle la tête d'impression doit aller pour que le tampon touche le substrat.
- **Break [Esc]** (qui est également activé par la touche "Esc" sur le clavier) est toujours actif et vous donne la possibilité d'interrompre un processus en cours d'exécution en cas d'urgence. Si jamais vous avez appuyé sur [Break (Esc)], vous devez réinitialiser votre système avec [Init Z]. La réinitialisation se fait automatiquement si vous appuyez sur « Ok » dans le pop-up suivant:
- **Inking (Encrage):** Pour définir le temps d'encrage (heures: minutes: secondes) et de commencer un encrage classique par immersion du timbre dans une solution sur la station d'encrage.
- **Dry-Inking (Encrage à sec):** Pour effectuer un "encrage à sec", dans laquelle le tampon est pressé sur une surface sur laquelle une encre sèche ou semi-sèche a été étalée (habituellement par spin-coating). Mis à part le temps de contact (heures: minutes: secondes) vous devez entrer la hauteur Z et une P1 si une surpression dans le tampon doit être utilisé.
- **Drying (Séchage):** Pour définir le temps de séchage et activer le séchage. Cliquez sur "Ink Table Lift up" par défaut, cela permet de relever la table lors du séchage de sorte que la solution d'encre résiduelle puisse être absorbée par la nappe.
- **UV Lamp (Lampe UV):** Définit le temps d'irradiation de la source LED-UV dans votre double tête d'impression et active la source d'UV. S'il vous plaît ignorer si seulement une seule tête est installé.
- **Heating table (Chauffage de la Table):** Contrôle le chauffage / refroidissement du porte-substrat. Avec les deux cases sur la gauche, "Heat up" et "Cool down", activer le chauffage contrôlé ou le refroidissement pneumatique de retour à la température ambiante. La partie supérieure du champ à droite définit la température de chauffage. Le champ en bas à droite indique la température de l'élément chauffant, mais seulement si la fonction chauffage / refroidissement a été vérifiée.
- **Stamping Tool Exchange (Fonction d'Echange du Tampon):** Lance l'échange d'un tampon. Pour ce faire, déplacer le porte-tampon avec le timbre de PDMS désiré sous la tête d'impression. Pour prendre le tampon, appuyez sur le bouton [Take (F7)]. Pour éjecter un timbre de la presse écrite la tête après utilisation, déplacer une position vide du porte-tampon sous elle et appuyez sur [Eject (F8)]. Les deux champs de paramètres définissent le niveau-Z dans lequel le tampon est pris et relâcher.  
Remarque: Les valeurs par défaut pour le corps en polycarbonate de timbre norme sont 17,0 à 17,4 mm. Assurez-vous de les changer, si vous utilisez un timbre PDMS non standard. S'il vous plaît noter également qu'il doit y avoir une ouverture supplémentaire dans le porte-tampon si une double tête d'impression avec UV-LED est présente.
- **Stamping (Imprimer):** Le panneau "Stamping" contient deux boutons : [Stamp (F9)] et [NIL-Process], pour respectivement soit  $\mu$ CP ou NIL. Les deux champs pour "Pre-Position"

et "Contact Level" définissent les deux niveaux de hauteur qui contrôlent le mouvement de la tête d'impression en Z vers le substrat. Pour déplacer la tête d'impression à partir de sa position de départ (en haut) à la « Pre-Position » nous vous suggérons d'utiliser des vitesses plus élevées Z-motion de e. g. 8-10 mm/sec, alors que pour l'approche finale au niveau de contact vous devez utiliser des valeurs beaucoup plus faibles comme de 0,01 à 1,0 mm/sec. S'il vous plaît prendre soin aussi des pressions qui sont exercées au cours de ces phases:

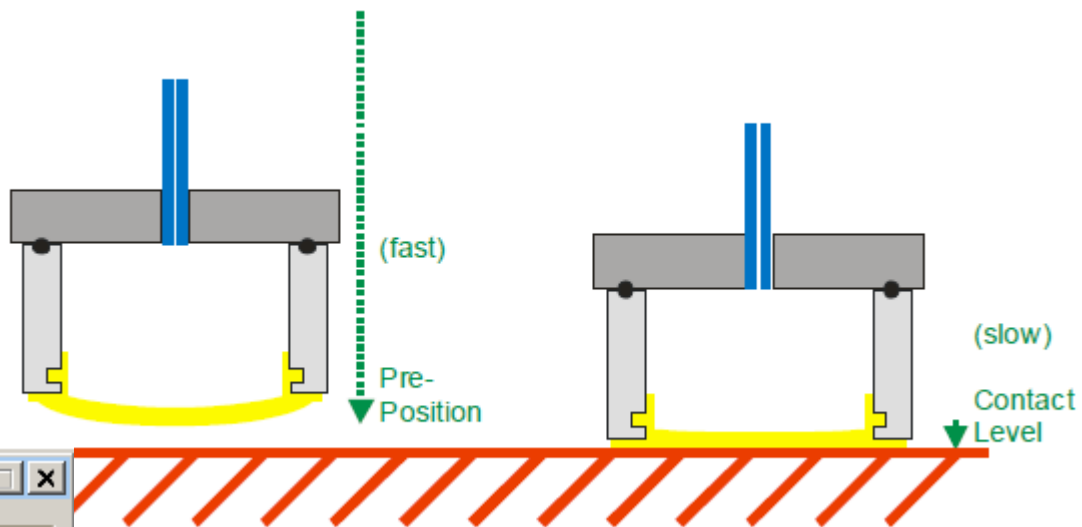
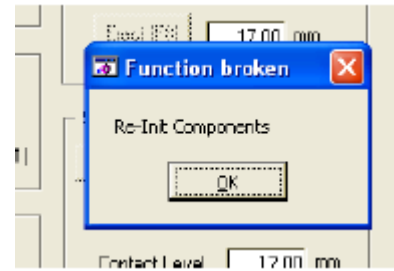


Figure 61. Schéma explicatif du déplacement de la tête d'impression

- **Setup (Configuration)** : Ce bouton ouvre une fenêtre pour définir plusieurs paramètres importants pour l'impression. Décrit plus tard.
- **Quit (Quitter)** : Termine le programme.
- [ $\gg$ ] Le bouton double flèche, [ $\gg$ ] ou [ $\ll$ ], permet de développer ou réduire un panneau supplémentaire où vous définissez des fonctions supplémentaires qui ne sont pas utilisées tout le temps. Ceci est expliqué en détail dans le chapitre suivant.

#### Interface optionnelle [ $\gg$ ]

- **[Init Z]**: initialise l'axe-Z. Utiliser après un problème mécanique.
- **"Toggle Z"**: active ou désactive le mouvement en Z manuel de la tête d'impression. Ce mouvement est alors contrôlé en appuyant sur "Page up" ou

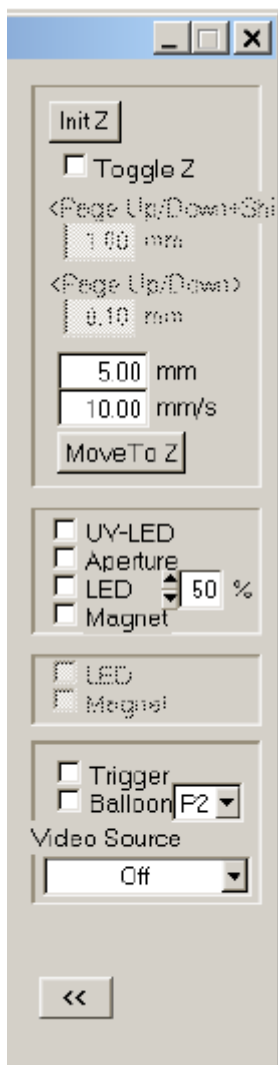


Figure 62. Interface optionnelle

"page down" de votre clavier, par incréments de 0,1 mm (ou 1 mm, si la touche Maj est pressée en même temps).

- **[Move to Z]:** entraîne la tête d'impression à la position Z prédéfinie à la vitesse donnée dans mm / sec. Utiliser avec précaution!
- **"UV-LED", "Aperture", "LED", "Magnet":** Lorsque vous cliquez sur ces cases, les fonctions correspondantes de la double tête d'impression pour NIL sont activés, qui peut être utilisé pour tester ou créer un protocole complet pour NIL. Rappelez-vous que les LED UV internes ne peuvent être utilisés de manière interactive, i. e. chaque fonction doit être démarré manuellement, puis arrêté en cliquant à nouveau.
- **"Trigger":** active le port de déclenchement pour tester le signal de sortie de déclenchement.
- **"Balloon":** gonfle le tampon PDMS comme un ballon. Peut être utilisé pour tester la fonction ou pour vérifier si une nouvelle membrane PDMS est étanche à l'air. Si elle est utilisée conjointement avec le mouvement interactif "page up" ou "page down" vous pouvez trouver le niveau de bonne hauteur pour le plein contact pendant l'impression (mieux sous contrôle du microscope). Vous pouvez choisir de gonfler le ballon soit avec pression P1 ou P2, respectivement.
- **"Source vidéo":** définit une adresse de canal vidéo, si vous avez plus d'un vidéo microscope. "Off" est la valeur par défaut, si un seul microscope est présent.

Utilisez la double flèche [ << ] pour réduire la fenêtre principale à sa taille originale.

## Interface de configuration (Setup)

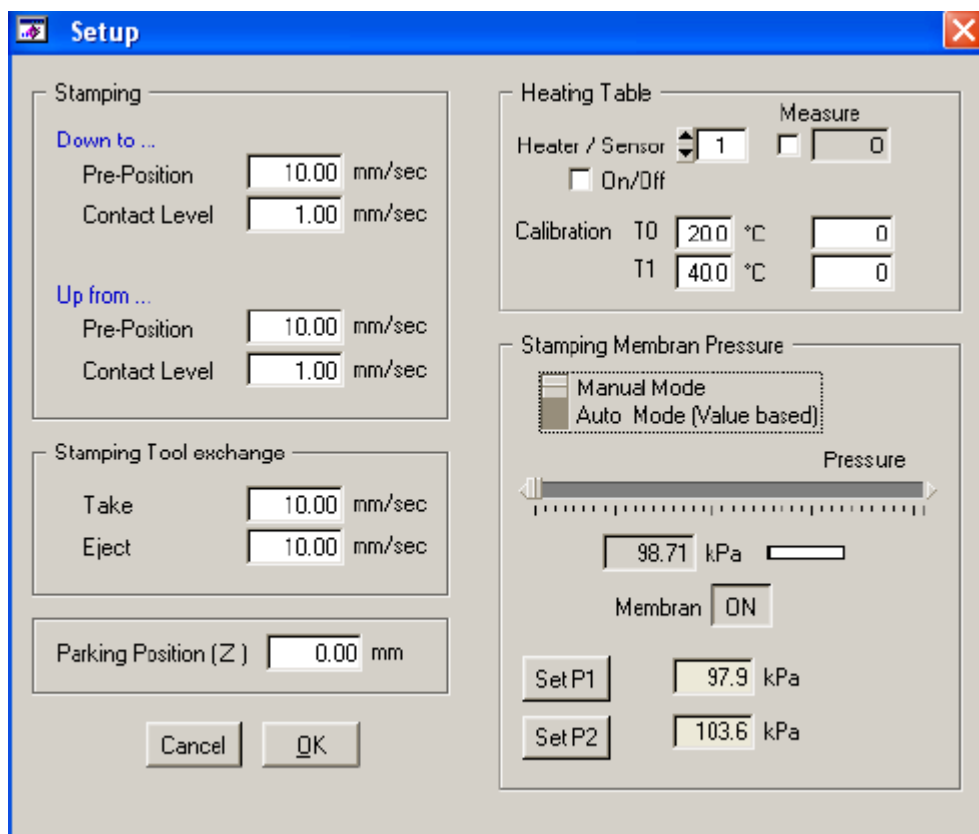


Figure 63. Interface de configuration

- **Stamping:** Ici, vous définissez les paramètres de mouvement pour la tête d'impression, la plus haute vitesse recommandée étant de 10 mm / sec. Utilisez une valeur élevée pour entraîner la tête à la « Pre-Position » et une valeur beaucoup plus faible pour le déplacer vers le niveau de « Contact Level » (voir fig. 31 pour une explication). Cependant, tant que vous développez une nouvelle méthode vous devez utiliser une vitesse très faible pour les deux valeurs. L'effet de la vitesse sur la qualité d'impression doit être étudié pour chaque nouveau projet d'impression. Vous pouvez utiliser différents paramètres pour les mouvements vers le haut et vers le bas, mais ce n'est pas forcément utile.
- **Stamping Tool Exchange:** Définit la vitesse pour l'entraînement de l'axe Z à prendre ou à éjecter le tampon. Valeurs  $\leq 10$  mm / sec.
- **Parking Position:** Dans ce champ de paramètre est défini le niveau-Z de la tête d'impression après l'initialisation du système. Après avoir activé le bouton [Init Z], le Z-drive se déplace automatiquement vers la position de stationnement.
- **Heating Table:** Avec ce panneau, le capteur de température sur le porte-substrat de chauffage/refroidissement est étalonné. Ceci est uniquement nécessaire si vous échangez le capteur.

## Membrane Stamping

- **Pression:** Définit le déroulement de la pression de l'air sur la membrane PDMS lors de l'emboutissage. Vous pouvez basculer entre les deux modes à l'aide de l'interrupteur coulissant: dans le mode manuel les pressions choisies sont instantanément générées de sorte que vous pouvez voir à quel point la membrane de timbre est bombée. Dans le mode automatique, rien ne se passe, mais vous pouvez néanmoins définir les valeurs de pression. Pour augmenter la pression, tirez le commutateur coulissant vers la droite. En dessous, la pression est représentée comme une valeur numérique et comme un code couleur (pour vous avertir)

Si vous réglez le commutateur "Membran" sur [ON], comme le montre la Figure, la membrane de timbre est bombée dans le mode manuel. En appuyant sur les touches [P1] ou [P2], la pression réelle peut être directement attribuée à ces valeurs. Si vous voyez que la pression est trop élevée, vous pouvez régler le commutateur "Membrane" rapidement à [OFF]. (Dans le mode automatique, rien ne se passe vraiment.)

**ATTENTION:** Ne pas définir des valeurs trop élevées aussi longtemps que le timbre n'est pas en contact direct avec le substrat ("Contact Level"), sinon la membrane peut déchirer. La valeur de pression P2 a été inventée pour utiliser des valeurs plus élevées lors d'un contact.

Expérience numéro	PDMS sans traitement	PDMS traitement PFDTs ; Température de trempage (°C) ; Temps de trempage (h)											
		25°C ; 1h	25°C ; 2h	25°C ; 3h	25°C ; 4h	25°C ; 5h	25°C ; 6h	80°C ; 1h	80°C ; 2h	80°C ; 3h	80°C ; 4h	80°C ; 5h	80°C ; 6h
1	110,37	105,39	110,69	109,83	107,38	111,05	107,7	115,21	115,54	116,45	117,65	118,53	114,54
2	113,91	107,65	109,42	108,21	110,14	111,69	107,73	115,84	116,82	117,15	116,12	117,74	115,25
3	113,62	101,41	110,06	109,83	111,68	109,16	107,44	115,99	117,66	116,07	118,35	117,05	116,89
4	113,87	87,52	112,08	112,54	109,31	110,66	110,9	116,55	115,01	116,54	117,99	117,4	117,47
5	112,51	107,25	110,69	110,04	111,96	109,8	110,5	114,47	116,28	117,94	119,17	116,02	113,79
6	113,55	108,92	111,36	112,48	111,57	110,13	102,68	115,97	115,53	118,65	119,27	118,16	113,46
7	112,16	110,23	112,84	108,86	110,42	110,83	103,31	114,66	116,33	116,62	118,4	115,99	111,24
8	113,98	105,32	102,87	109,04	109,43	110,44	106,58	116,61	119,1	116,07	117,2	116,65	113,8
9	113,41	109,98	107,05	112,51	109,54	111,39	101,96	114,05	118,16	117,54	117,08	116,46	113,4
10	114,25	100,87	102,22	107,83	111,37	111,12	102,28	115,68	115,46	117,67	115,91	118,17	115,05
11	114,52	99,36											
12	116,2												
13	114,92												
14	114,95												
15	115,25												
16	114,59												
17	114,98												
18	114,07												
19	113,91												
20	114,42												
Moyenne	113,972	103,990909	108,928	110,117	110,28	110,627	106,108	115,503	116,589	117,07	117,714	117,217	114,489
Variance	1,551027368	43,5963291	13,7899733	3,21764556	2,03275556	0,58826778	11,2060844	0,76629	1,79176556	0,74537778	1,32864889	0,85435667	3,25685444
Ecart-type	1,245402493	6,60275163	3,71348534	1,79377968	1,42574737	0,76698617	3,34754902	0,87537992	1,33856847	0,86335264	1,15267033	0,92431416	1,80467572
Moyenne des moyennes		108,3418182						116,4303333					

Tableau 6. Tableau des résultats bruts de l'étude de mouillage

## Annexe 5 : Résultats du l'étude de mouillage

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.



**BONAMENT Alexi**

**CONCEPTION ET REALISATION D'UN BIOCAPTEUR EN UTILISANT L'IMPRESSION PAR MICROCONTACT POUR LA DETECTION DU TNF-A DANS LA SALIVE: DEPISTAGE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017, 97 p.

**RESUME**

Alors que les problèmes cardiaques restent l'un des problèmes majeurs de santé publique en France, de nouvelles techniques d'analyses voies le jour afin d'améliorer la qualité des soins par un dépistage plus efficace et si possible moins chère.

Dans ce projet nous nous sommes concentrés sur l'insuffisance cardiaque et sur l'un de ses biomarqueurs caractéristique : le TNF- $\alpha$  dans la salive.

Dans ce rapport, nous présentons donc une méthode simple pour la fabrication d'un biocapteur en utilisant l'impression microcontact pour détecter le TNF- $\alpha$  dans la salive pour les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Le biocapteur a été développé en utilisant l'impression par microcontact de TESUD 1% (v / v) sur du PDMS activé par plasma / O<sub>2</sub>. Des anticorps spécifiques au TNF- $\alpha$  ont été, ensuite, lié au substrat par imination avec l'aldéhyde du TESUD en solution basique et stabilisée avec du NaBH<sub>3</sub>CN.

Pour surveiller le niveau critique de TNF- $\alpha$ , nous avons utilisé une technique de détection photoluminescente avec des anticorps secondaires détecté par microscopie à fluorescence. Le projet a abouti à la création d'un biocapteur souple en PDMS spécifique au TNF-a ; il reste cependant encore quelques caractéristiques à optimiser pout avoir un dispositif fonctionnel.

**MOTS CLES**

TNF- $\alpha$  ; Insuffisance cardiaque ; biocapteur ; impression par microcontact ; biofonctionnalisation ; PDMS ; TESUD ; anticorps spécifiques.

**JURY**

M. BARAKET Abdellatif, Docteur Université Claude Bernard Lyon 1

M. ERRACHID EL SALHI Abdelhamid, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1

Mme. LANCELOT Sophie, Maitre de Conférences- Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

M. PAILLER-MATTEI Cyril, Maitre de Conférences, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

Mme. VINCIGUERRA, Professeure- Praticien Hospitalier, Faculté de pharmacie de Lyon-ISPB

**DATE DE SOUTENANCE**

20 Février 2017

**ADRESSE DE L'AUTEUR**

71, rue Villon – 69008 Lyon