N° d’ordre NNT : 2026ECDL0014

THESE DE DOCTORAT DE L’ECOLE CENTRALE DE LYON
membre de l’Université de Lyon

Ecole Doctorale N°160
EEA - Electronique, Electrotechnique, Automatique de Lyon

Spécialité de doctorat : Ingénierie pour le vivant

Soutenue publiquement le 26 mai 2026, par :

Hélène JOUSSET

Développement d'une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur pour le suivi des sécrétions d'organoïdes.

Devant le jury composé de :

Charlotte RIVIERE, Professeure des universités, Institut Lumière Matière - UCBL - CNRS	Présidente
Benoit CHARLOT, Directeur de recherche, Institut d'Electronique et des Systèmes (CNRS) - Université de Montpellier	Rapporteur
Thérèse LEBLOIS, Professeure des universités, UMLP Femto-ST (CNRS)	Rapporteure
Cécile LEGALLAIS, Directrice de recherche, Laboratoire Biomécanique et bioingénierie (BMBI), Université de Compiègne	Examinatrice
Emmanuelle LAURENCEAU, Maîtresse de conférences HDR, Ecole Centrale de Lyon (Institut des Nanotechnologies de Lyon)	Directrice de thèse
Charlotte PARENT, Ingénieure docteure, CEA Leti	Co-encadrante de thèse
Cécile Jamois, Chargée de recherche, Institut des Nanotechnologies de Lyon	invitée

Unité de recherche : INL - Institut des Nanotechnologies de Lyon

À mon neveu Adam

« The cold never lasts, my darling
It just teaches the heart how to burn »

RAYE, Click Clack Symphony

Résumé

Les organoïdes-sur-puce sont des dispositifs permettant la culture de modèles cellulaires tridimensionnels dans un microenvironnement contrôlé. Plus proches des conditions *in vivo* que les cultures traditionnelles grâce à la microfluidique, ces systèmes offrent de nouvelles perspectives pour la recherche médicale. L'étude de ces modèles repose en partie sur l'analyse du sécrétome pour mieux comprendre les processus biologiques complexes. Toutefois les méthodes actuelles comme le dosage ELISA présentent des limitations, notamment avec un temps d'analyse élevé, une consommation importante d'échantillons et de réactifs et l'impossibilité d'une détection en temps réel ou multipoints à court terme. Ces contraintes justifient la mise en place de nouvelles approches. Les biocapteurs constituent l'une des solutions proposées grâce à la possibilité de les intégrer au plus près de la culture cellulaire, de réaliser des analyses rapides, multiplexées, multipoints ou en temps réel. Cependant concevoir des dispositifs intégrant des biocapteurs constitue un véritable défi pluridisciplinaire impliquant des disciplines telles que la biologie, la chimie de surface, la physique et l'ingénierie. L'utilisation de biocapteurs dans des plateformes combinant culture cellulaire et analyse reste donc complexe à mettre en œuvre. C'est pourquoi ce projet de thèse propose de développer une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur optique en silicium basé sur la détection de fluorescence, en vue d'une future intégration avec la culture d'organoïdes de pancréas. Pour obtenir une plateforme compacte, robuste et automatisée, une technologie microfluidique pneumatique a été utilisée. Grâce à une intégration modulaire du biocapteur, la cartouche microfluidique est réutilisable. À partir de cette plateforme, un protocole de détection de l'interaction anticorps-antigène a été mis au point et a été optimisé. Ce protocole versatile permet une détection directe de biomolécules fluorescentes dans 7 canaux indépendants. Une première preuve de concept a démontré la possibilité de détecter de l'insuline à partir d'une détection sandwich utilisant la plateforme optofluidique. Par ailleurs, une nouvelle méthode de fonctionnalisation de surface éco-responsable a été développée en combinant une silanisation en solvant vert, l'éthanol, et une réaction de chimie click pour l'immobilisation orientée des biorécepteurs à la surface du capteur. Ce travail a donc permis de mettre en place les briques technologiques nécessaires au développement d'une future plateforme optofluidique complète intégrant la culture de l'organoïde, la récupération de ses sécrétions, et leur analyse multiplexée et en temps réel utilisant des biocapteurs par détection optique sans marquage.

Abstract

Organoids-on-a-chip are devices that enable the culture of three-dimensional cellular models in a controlled microenvironment. Thanks to microfluidics, these systems more closely mimic *in vivo* conditions than traditional cultures, offering new opportunities for medical research. The study of these models is partly based on secretome analysis to better understand complex biological processes. However, current methods such as ELISA assays have limitations, including long analysis times, high consumption of samples and reagents, and the inability to perform real-time or multipoints detection. These constraints highlight the need for new approaches, and biosensors are one of the proposed solutions, thanks to their ability to be integrated as closely as possible to the cell culture and to perform rapid, multiplexed, multipoint, or real-time analyses. However, designing devices that integrate biosensors is a true multidisciplinary challenge involving fields such as biology, surface chemistry, physics, and engineering. The use of biosensors in platforms combining cell culture and analysis therefore remains complex to implement. This is why this thesis project proposes to develop an optofluidic platform integrating a silicon optical biosensor based on fluorescence detection, aiming at future integration with pancreatic organoid culture. To achieve a compact, robust, and automated platform, pneumatic microfluidic technology was employed. Thanks to a modular integration of the biosensor, the microfluidic cartridge is reusable. Based on this platform, a protocol for detecting antibody-antigen interactions was developed and optimized. This versatile protocol enables the direct detection of fluorescent biomolecules across seven independent channels. An initial proof-of-concept demonstrated the ability to detect insulin using a sandwich assay on the optofluidic platform. Furthermore, a new eco-friendly surface functionalization method was developed by combining silanization in a green solvent, ethanol, with a click chemistry reaction for oriented immobilization of bioreceptors on the sensor surface. This work has thus established the technological building blocks necessary for the development of a future comprehensive optofluidic platform integrating organoid culture, the recovery of its secretions, and their multiplexed, real-time analysis using label-free optical biosensors.

Remerciements

Avant de vous plonger dans ces centaines de pages, je souhaite remercier une ribambelle de personnes qui ont cheminé à mes côtés pendant cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Charlotte Rivière, Benoit Charlot, Thérèse Leblois et Cécile Legallais, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci pour votre reconnaissance vis-à-vis de mes travaux et pour les échanges enrichissants que nous avons pu avoir dessus.

Merci également à mon encadrement de thèse sans qui ce projet n'aurait jamais eu lieu et qui m'a suivi jusqu'au bout. Plus particulièrement, merci Emmanuelle de m'avoir fait découvrir le monde de la chimie de surface. Cécile, merci pour tes conseils avisés, notamment pendant la rédaction. Charlotte, merci de m'avoir fait confiance pour ce sujet de thèse. Merci de m'avoir guidé et enseigné tout ce que tu savais sur la microfluidique. J'ai beaucoup appris à tes côtés et bien retenu tes supers métaphores de course à pied pour décrire le parcours d'une thèse ! Malgré les moments difficiles, je suis fière d'avoir fini cette thèse à vos côtés, merci.

Lors de cette thèse, j'ai pu voyager entre deux sites : le laboratoire de l'INL à Écully et le CEA Leti à Grenoble. J'ai donc croisé beaucoup de personnes pendant cette aventure et de nombreux remerciements sont de rigueur.

Du côté de l'INL, je remercie toute l'équipe DSE pour leur accueil et leur gentillesse. Yann et Thomas, merci pour votre aide lors de ma formation en chimie de surface. Isabel, merci pour tout ce que tu fais au laboratoire, pour ton soutien et ton écoute attentive. Yvana, merci pour tout le travail que tu as réalisé lors de ton stage. J'ai également partagé cette aventure avec Dahlia et Laëtitia. Dahlia, merci d'avoir été là dès le début de l'aventure, de m'avoir soutenue dans les moments difficiles et d'avoir été là aussi dans les bons moments ! Merci Laëtitia pour nos discussions endiablées, nos restaus partagés ensemble avec Dahlia et aussi, il faut bien l'avouer, pour nos plaintes existentielles. Merci également aux autres doctorants, ceux déjà présents au labo à mon arrivée puis ceux qui les ont précédés : Paule, Ana, Antonin, Harris, Oleh, Georgii, Morgane, Fryni, Eva, Pauline.

Du côté du CEA, je tiens tout d'abord à remercier Mathilde, ma maîtresse de stage de M2, pour m'avoir choisie mais aussi pour m'avoir donné envie de continuer en thèse. J'ai signé pour 6 mois et finalement Grenoble et le LSMB ont eu mon cœur de normande et je suis restée 3 ans et demi de plus. Comme quoi parfois des choix qui paraissent anodins peuvent finalement nous emmener bien plus loin que prévu…

Merci au programme FOCUS du CEA qui a permis le financement de cette thèse. Je tiens également à remercier Fabrice et Jean-Maxime, pour leur accueil et leur disponibilité en tant que chefs. Merci également à nos fantastiques secrétaires Nathalie et Laurence, toujours présentes pour nous aider et pour être une oreille attentive. Il y a des personnes qui ont vu de près mon projet et qui y ont activement participé, alors… Merci Hippolyte d'avoir été le

chimiste de surface de référence lorsque j'étais loin de l'INL et pour nos échanges autour de mon sujet. Caroline, merci pour toute ton aide avec la préparation de mes biocapteurs et pour tes sauvetages face au robot spotteur qui ne semblait pas beaucoup m'apprécier... Xavier, après le banc optique de mon stage, tu m'as ensuite énormément aidé à construire celui pour ma thèse et je t'en remercie. Ce fut un vrai plaisir de partager ces moments-là avec vous trois, merci pour votre gentillesse et pour le temps que vous m'avez accordé.

Merci également à toute l'équipe microfab pour la fabrication des cartouches microfluidiques. Merci donc à Manu pour ton expertise, à Alexandre pour mon super capot anti-lumière, Mahfod pour toutes les pièces que tu as découpées avec la laser, François pour les assemblages et ton aide pour la fabrication des joints (promis, un jour je te ramènerais ces fameuses crêpes), Stéphane, merci pour les super bancs microfluidiques. Ishaq, évidemment, merci pour toutes les cartes que tu as faites, ta gentillesse mais aussi pour toutes nos sessions discussions dans le labo (même si ça n'avait rien à voir avec le travail…).

Merci aussi au T-gang, mes consœurs thésardes arrivées avant moi, pour nos moments bureau des plaintes, de rébellion, de résilience et pour m'avoir montré le chemin. Katell, merci pour tes conseils, de t'être aussi occupée de Baga pendant mes absences et pour m'avoir initiée à la couture et au crochet ! Léna ou Queen of Larmes ou la plus stylée des thésardes, merci pour ton énergie pétillante et nos sessions Bastille. Marie, ma co-bureau préférée (ne le répète pas à Fred et Nico), merci pour tous tes encouragements et ton soutien sans faille ! Merci aussi à mes piou piou qui ont bien grandi. Valentin, King V, la force tranquille et mon cat-sitter préféré, et Océane, la Queen de la Bastille, une vraie fusée et une confidente en or. Vous avez été un véritable soutien pendant cette dernière ligne droite, merci. Et évidemment les petits derniers, ceux qui reprennent le flambeau : Louise, Ayşe, Jade et Juan. Merci aussi aux autres thésards pour nos discussions, nos sessions bars ou nos expéditions en conférence, Mohammed, Adélèyè Axelle, Amelia, Eve, Brunelle…

J'ai aussi pu rencontrer deux « new wave » LSMB, avec les arrivées des CDD. Merci à Joris qui est resté quasiment jusqu'au bout de mon aventure. Un rayon de soleil provenant, pourtant, des Pays-Bas. Merci pour nos fous rires, nos soirées et les moments un peu plus sérieux. C'était vraiment fromage au plafond de vivre ça avec toi ! Merci aussi à Hugo le roi du Goshindo et père Noël kidnappé à ses heures perdues, merci pour tes conseils toujours pleins de sagesse. Samir, qu'est-ce que tu m'as fait rire, mince alors, que tu es drôle, tu es parti trop vite du labo, merci d'être un bon vivant ! Aude, si gentille et si solaire, merci pour notre super atelier terrarium, même s'ils n'ont pas survécu à mon chat… Merci aussi à Paul, Thibaut, Thomas, Aurélien, Leslie, les stagiaires et les alternantes de cette première vague pour tous les moments partagés ensemble autour d'un café, d'un jeu de société, d'un bon repas à H3 ou au pied de la Bastille. La deuxième vague de CDD n'est pas en reste, alors merci infiniment à Julie, Solène, Guillem, Baptiste, Charles et Lucie pour avoir pris le relai et d'être tout aussi extras !

Maintenant passons à ceux qui restent, les murs du labo : les permanents. Myriam, notre modèle à toutes, merci pour tous tes conseils avisés. Yves, merci pour ton aide pendant le stage et pendant la thèse ! Ce fut un véritable plaisir de pouvoir apprendre auprès de toi.

Merci Camille pour la relecture de mon chapitre 1, pour toutes nos discussions et vos conseils avec Morgane. Nath et Séverine, merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et pour nos sessions à la Bastille (team limace forever). Fred, merci pour ton oreille attentive, j'espère que tu arriveras à faire pousser ton avocatier. Avec Nico, vous m'avez bien fait rigoler dans ce carré d'or VIP ! Mais aussi merci à Mélissa, Anne-Gaëlle, Marie-Line, Remco, Patricia et Guillaume. Le DTIS et le LSMB resteront longtemps dans ma mémoire ! Merci aussi à Fanny et Joao de m'avoir permis de préparer sereinement ma soutenance tout en débutant cette nouvelle aventure scientifique chez Nawu Diagnostics.

Il y a également toutes les personnes en dehors de cet écosystème scientifique que j'ai la chance d'avoir dans ma vie. À mes copains de TPS, les Lyonnais : Quentin, merci pour ton excentricité rafraichissante et ton enthousiasme ! Tes goûts cinématographiques et musicaux sont excellents, j'espère qu'on pourra wickeder et débloquer encore longtemps ensemble. Pareil pour Elise et Paul, mes sauveurs tout simplement, qui m'ont toujours hébergé, même après les avoir réveillés à 3h du matin avec un mousti-botox imprévu, et Pauline notre randonneuse invétérée qui nous a motivés à l'achat de tout le matériel pour passer des moments inoubliables cachés dans les montagnes. Merci aussi à Alexia pour ton optimisme et pour m'avoir invité à partager un mois avec toi dans le pays de nos rêves, le Japon. Merci à Emma pour nos week-ends blabla, glace et balade, un combo parfait pour se changer les idées ! J'ai pu aussi faire de nouvelles rencontres à Grenoble. Isa et Panda, merci de m'avoir accueillie dans votre coloc lorsque j'étais une petite thésarde perdue entre deux villes. Merci aussi Isa et Nath pour nos soirées horreur du jeudi, une bouffée d'air frais et de frisson dans le train-train quotidien de la thèse. Je n'oublie pas non plus tous les copains de ma belle Normandie. Malgré la distance, rien ne m'empêchera de venir profiter de notre beau Perche avec vous !

À ceux qui m'accompagnent depuis toujours : ma famille. Papa et Maman, vous m'avez toujours soutenu dans mon parcours. Même si tout ce monde scientifique vous est inconnu, vous avez été mes piliers pendant toutes ces années et sans vous je ne serai pas là où j'en suis, alors un grand merci. Merci aussi à ma sœur Charlène dont la force m'inspire chaque jour et me pousse à toujours continuer d'avancer. À ma mamie adorée, ma force de la nature. À Baga, mon petit chat qui, sans s'en rendre compte, a partagé avec moi mes longues heures de rédaction à la maison, toujours allongée sur mes genoux, un vrai moteur pour avancer !

Et je termine avec le meilleur pour la fin : Maxime, *my partner in crime*. Merci d'être là pour moi depuis plus de 10 ans et dans toutes les circonstances. Merci pour tout ce que tu as fait à la maison. Ce soutien était réellement inestimable et indispensable. Sans toi, très clairement, cela aurait été beaucoup plus difficile (surtout pour me nourrir, avouons-le...). Merci de toujours m'aider à me relever, dans tous les sens du terme, épaule luxée ou non. Merci d'être là et d'être toi.

Les remerciements sont souvent les derniers mots que l'on écrit dans notre manuscrit de thèse et pourtant ce sont les premières pages du manuscrit. Il n'est jamais facile de tourner une page aussi dense, mais pour moi c'est sur ces mots que s'achèvent trois ans et demi de thèse et de vie. À présent, je vous laisse découvrir mon travail, en espérant qu'il vous soit utile d'une quelconque façon.

PS : Oui, j'écris autant que je parle…

Table des matières

Résumé ..... **iii**

Abstract ..... **v**

Remerciements ..... **vii**

Glossaire ..... **xvii**

Introduction **1**

Chapitre I : Laboratoires-sur-puce pour le suivi de sécrétions d'organoïdes **3**

I.1 Sphéroïdes et organoïdes : nouveaux modèles d'étude *in vitro* 4

I.1.1 Contexte et limitations des modèles biologiques pour la recherche et la médecine 4

I.1.2 Les sphéroïdes et organoïdes pour une approche tridimensionnelle de la culture cellulaire 5

i. Définitions et caractéristiques des sphéroïdes et organoïdes 5

ii. Culture de sphéroïdes et d'organoïdes : méthodes et limitations 6

I.2 La Microfluidique pour la culture cellulaire 3D : les organoïdes-sur-puce 7

I.2.1 La microfluidique : technologies et avantages 7

i. La microfluidique, la science des fluides à l'échelle micrométrique 7

ii. Matériaux pour la fabrication des Lab-on-chip 9

I.2.2 Techniques de contrôle de flux en microfluidique 10

i. Microfluidique passive 10

ii. Microfluidique active 10

iii. Déplacement dirigé des fluides 11

I.2.3 La microfluidique pour l'étude de modèles cellulaires *in vitro* plus avancés 13

I.3 Techniques d'analyse et de suivi des organoïdes et sphéroïdes 18

I.3.1 Méthodes analytiques conventionnelles 18

i. Microscopie optique 18

ii. Analyse du matériel génétique 18

iii. Les immunodosages 19

iv. Limitations des méthodes conventionnelles 19

I.3.2 Intégration des immunodosages en microfluidique 20

I.4 Biocapteurs : principe et intégration microfluidique 24

I.4.1 Les biocapteurs pour l'analyse d'échantillons biologiques 24
i. Principe de fonctionnement d'un biocapteur 24
i. Transducteur optique avec marquage 25
ii. Transducteur optique sans marquage 25
iii. Fonctionnalisation chimique et biologique de surface du capteur 29
I.4.2 Intégration et automatisation des biocapteurs en microfluidique 31
i. Système de contrôle fluidique pour les biocapteurs 31
ii. Méthodes et critères d'intégration des biocapteurs en laboratoires-sur-puce 32
iii. Laboratoires-sur-puce intégrant des biocapteurs optiques 33
I.5 Biocapteurs pour l'analyse et le suivi des organoïdes-sur-puce 36
I.5.1 Critères pour une plateforme de suivi d'organe-sur-puce 36
I.5.2 État de l'art des plateformes de culture et de suivi d'organoïdes et organes-sur-puce 37
I.6 Discussion 42
I.7 Problématique et objectifs du projet de thèse 44
Chapitre II : Matériels et méthodes 47
II.1 Élaboration du biocapteur 48
II.1.1 Caractéristiques du biocapteur 48
II.1.2 Fonctionnalisation chimique de la surface du capteur en silicium 49
i. Silanisation en phase gaz du capteur en silicium 49
ii. Silanisation en phase liquide du capteur en silicium 51
iii. Immobilisation des anticorps 53
iv. Méthodes de caractérisation de surfaces 57
II.2 Plateforme optofluidique pour la détection de biomolécules par fluorescence 58
II.2.1 Technologie microfluidique 58
i. Principe de la technologie de vannes pneumatiques 58
ii. Fabrication de la cartouche microfluidique 59
II.2.2 Banc d'expérimentation microfluidique modulable 61
i. Interface de commande de la cartouche microfluidique 61
ii. Module optique pour la détection de fluorescence 64
iii. Logiciel de contrôle : Uflu 67
iv. Plateforme optofluidique complète 69
II.3 Méthodes d'acquisition et de traitement des données 69

II.3.1 Méthode d'acquisition des données de fluorescence 69
II.3.2 Méthodes de traitement des données de fluorescence 71
i. Prétraitement 71
ii. Standardisation des résultats à partir d'une zone de référence 72
Chapitre III : Développement et caractérisation d'un système optofluidique intégrant un biocapteur 79
III.1 Élaboration d'une cartouche microfluidique réutilisable intégrant un biocapteur de fluorescence 80
III.1.1 Développement d'une solution modulaire 80
i. Assemblage pour l'intégration modulaire du biocapteur 80
ii. Validation de l'assemblage modulaire 82
III.1.2 Choix de l'actionnement fluidique 84
i. Microfluidique digitale FlowStretch 85
ii. Micro-pompe pneumatique : actionnement fluidique par cycle péristaltique ... 86
iii. Microfluidique en flux continu par régulation de pression 87
III.2 Conception et validation des cartouches microfluidiques en fonction de l'actionnement fluidique 88
III.2.1 Cartouche microfluidique pour l'actionnement en flux continu 88
i. Conception de l'architecture microfluidique 88
ii. Cartouche microfluidique intégrant le biocapteur 89
iii. Caractérisation et validation de l'actionnement fluidique dans la cartouche 90
iv. Discussion 94
III.2.2 Cartouche microfluidique intégrant une micro-pompe 95
i. Architecture de la cartouche microfluidique intégrant une micro-pompe 95
ii. Caractérisation de l'actionnement par micro-pompe 97
iii. Discussion 104
III.3 Caractérisation et validation du module optique 105
III.3.1 Validation de l'illumination du banc optique 105
i. Test de la reproductibilité de l'illumination de la LED 105
ii. Tests de l'uniformité de l'illumination avec une lame autofluorescente non calibrée 106
iii. Test avec une lame de calibration de microscope 107
iv. Discussion 111

III.3.2 Caractérisation et validation de l'intégration du biocapteur dans la cartouche microfluidique pour la mesure de fluorescence 111
i. Détection des plots fluorescents sans cartouche microfluidique 112
ii. Détection des plots fluorescents dans la cartouche microfluidique 113
iii. Optimisation de l'assemblage de la cartouche en COC 114
iv. Limitations du COC 116
v. Intégration hétérogène d'une fenêtre en verre 117

Chapitre IV : Validation et optimisation d'un protocole d'immunodétection sur silicium avec la plateforme optofluidique 121

IV.1 Développement et validation d'un protocole d'immunodétection en microfluidique 122
IV.1.1 Étapes préliminaires de préparation de la cartouche microfluidique..... 122
i. Passivation de la cartouche microfluidique 122
ii. Optimisation de la gestion fluidique pour réduire l'apparition de bulles d'air 122
IV.1.2 Intégration du protocole de biodétection..... 124
IV.1.3 Qualification de la plateforme : spécificité et reproductibilité..... 126
i. Étude de la spécificité de l'immunocapture 126
ii. Reproductibilité des résultats : intracapteur 128
iii. Reproductibilité des résultats : inter-capteurs 128
IV.2 Étude des paramètres pouvant influencer l'interaction biorécepteur-cible..... 129
IV.2.1 Description des différents paramètres..... 129
IV.2.2 Influence de la concentration et du volume de sonde..... 130
i. Concentration du biorécepteur 130
ii. Volume déposé de biorécepteur 132
IV.2.3 Influence du temps d'injection 134
IV.2.4 Influence du temps d'intégration..... 140
IV.2.5 Influence du débit..... 141
IV.2.6 Influence des différents paramètres sur la sensibilité de détection..... 145
IV.2.7 Discussion..... 148
IV.3 Détection d'insuline pour le suivi d'un organoïde de pancréas..... 153
IV.3.1 Contexte en laboratoire : analyse des sécrétions d'insuline d'un organoïde de pancréas pour l'étude du diabète de type 1 153
IV.3.2 Intégration d'un protocole d'immunodosage « sandwich »..... 155
i. Protocole d'immunodosage « sandwich » en cartouche microfluidique 155

ii. Détection d'insuline avec le système optofluidique 156
IV.3.3 Discussion 159
Chapitre V: Vers une fonctionnalisation de surface verte et orienté 161
V.1 Fonctionnalisation de surfaces en phase liquide : silanisation éco-responsable ... 162
V.1.1 Fonctionnalisation de surface par silanisation 162
i. Les organosilanes 162
ii. Réaction de silanisation sur un substrat 163
V.1.2 Paramètres réactionnels influençant la réaction de silanisation par voie liquide 165
i. Activation de la surface 165
ii. Influence de la quantité d'eau 165
iii. Influence du pH 166
iv. Influence du solvant 167
v. Influence de la quantité de silanes et du temps de réaction 169
vi. Influence de la température 170
V.1.3 Développement d'une méthode de silanisation de surface SIO_2 éco-responsable 170
i. Chimie verte et solvants 170
ii. Étude préliminaire avec l'APTES 170
V.1.4 Caractérisation de la silanisation en phase liquide 171
i. Paramètres étudiés 171
ii. Caractérisation par mesure de l'angle de contact 172
iii. Caractérisation par XPS 172
V.2 Immobilisation orientée des anticorps par chimie click 177
V.2.1 Principe de la chimie click 177
V.2.2 Caractérisation de la réaction de chimie click 178
V.2.3 Caractérisation de la réactivité biologique 180
i. Caractérisation en statique 180
ii. Caractérisation en flux avec la plateforme optofluidique 182
V.3 Discussion 183
Conclusion et perspectives 187
Annexes 193
Bibliographie 227

Glossaire

Re	Nombre de Reynold
LOC	Lab-On-Chip, *laboratoire-sur-puce*
µTAS	Micro Total Analysis System
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
PMMA	Poly(Méthacrylate de méthyle)
COC	Copolymère Oléfine Cyclique
OoC	Organ-on-Chip, *organe-sur-puce*
ECM	ExtraCellular Matrix, *matrice extracellulaire*
ADN	Acide Désoxy Nucléique
ARN	Acide RiboNucléique
PCR	Polymerase Chain Reaction, *amplification en chaîne par polymérisation*
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification, *amplification isotherme médiée par les boucles*
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *technique d'immunoadsorption par enzyme liée*
CLIA	ChemiLuminescent ImmunoAssay, *immunodosage par chimiluminescence*
FIA	Fluorescent-linked ImmunoAssay, *immunodosage par fluorescence*
LOD	Limit Of Detection, *limite de détection*
LOQ	Limit Of Quantification, *limite de quantification*
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor, *semi-conducteur métal-oxyde complémentaire*
PSA	Prostatic Specific Antigen, *antigène spécifique de la prostate*
PVC	PolyVinyl Chloride, *polychlorure de vinyle*
FRET	Förster Resonant Energy Transfer, *transfert d'énergie entre molécules fluorescentes*
SPR	Surface Plasmon Resonance, *résonance plasmon de surface*
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance, *résonance plasmon de surface localisée*

SPRi Surface Plasmon Resonance imaging, *imagerie par résonance plasmonique de surface*

Plasma O_2 Plasma d'oxygène

GST-α Glutathione S-Transférase Alpha

CRP C-Reactive Protein, *protéine C réactive*

IL Interleukine

AF488 AlexaFluor 488

EHTES 5,6-eEpoxyHexylTriEthoxySilanes

Silane-PEG-DBCO TriéthoxySilane- PolyÉthylène Glycol DiBenzoCycloOctyne

Silane-PEG-OH TriéthoxySilane- PolyÉthylène Glycol-Hydroxy

PBS Phosphate-buffered Saline, *tampon phosphate salin*

BSA Bovine Serum Albumin, *albumine de sérum bovin*

AC Angle de Contact

XPS X-ray Photoelectron Spectroscopy, *spectrométrie photoélectronique X*

CAO Conception Assistée par Ordinateur

SSbD Safe and Sustainable-by-Design, *sûr et durable dès la conception*

EPDM Ethylène-Propylène-Diène Monomère

CV Coefficient de Variation

GSIS Glucose-Stimulated Insulin Secretion

SAMs Self-Assembled Monolayers)

APTES 3-AminoPropyl)TriEthoxySilane

HNT Halloysite NanoTube, *nanotube d'halloysite*

AFM Atomic Force Microscopy, *microscope à force atomique*

DMSO DiMéthylSulfOxyde

EtOH Éthanol

CuAAC Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition

SPAAC Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition

Fc Fragment Cristallisable

Introduction

Développer un nouveau médicament ou traitement est un processus complexe, long et coûteux qui commence par le ciblage des candidats-médicaments, suivi d'une première phase préclinique puis d'une phase clinique et enfin d'une potentielle autorisation de mise sur le marché. Avec plus de 10 000 molécules candidates au départ, en moyenne seulement l'une d'entre elles pourra finalement être acceptée après 10 à 15 ans de développement et plus d'un milliard de dollars d'investissement. Au cours de ce processus, la grande majorité des molécules candidates sont donc écartées. En effet, même après avoir passé les tests précliniques avec succès, neuf candidats-médicaments sur dix échoueront au cours des trois phases cliniques, phases particulièrement coûteuses. Ces constats mettent en évidence les limites des modèles précliniques actuels qui ne reflètent pas suffisamment la physiologie humaine pour garantir une sélection pertinente des candidats médicaments. Dans ce contexte, de nouveaux modèles de culture cellulaire tridimensionnels ont été développés au cours des dernières décennies. Parmi eux, les sphéroïdes et organoïdes constituent une avancée majeure pour la production de modèles imitant les fonctions et l'organisation des tissus humains. Leur intégration dans des dispositifs microfluidiques a conduit au développement de systèmes appelés organoïdes-sur-puce, qui permettent de recréer un microenvironnement contrôlé se rapprochant des conditions *in vivo*. Ces plateformes offrent des modèles prometteurs pour le criblage pharmacologique, mais également pour la modélisation de maladies et la médecine personnalisée. Malgré la complexité croissante de ces systèmes, les méthodes d'analyse conventionnelles restent les méthodes de référence, notamment pour l'étude du sécrétome, c'est-à-dire l'ensemble des molécules sécrétées par les cellules, avec l'utilisation d'immunodosages tels que le test ELISA. Bien que robustes et sensibles, ces méthodes présentent plusieurs limitations par rapport aux organoïdes-sur-puce. Ce sont des techniques qui nécessitent un temps d'analyse élevé et incompressible de 2 à 3 heures, mais aussi des volumes d'échantillons relativement importants et requièrent l'intervention régulière d'un opérateur qualifié. De plus, elles ne permettent ni un suivi en temps réel, ni une analyse multipoints sur des courtes échelles de temps, ce qui réduit leur pertinence pour l'étude de systèmes dynamiques tels que les organoïdes-sur-puce. Pour dépasser ces limitations et offrir des systèmes d'analyse réellement adaptés, le développement de dispositifs intégrant des biocapteurs apparaît comme une solution prometteuse.

Les biocapteurs permettent une détection rapide, spécifique, multiplexée, multipoints ou en temps réel de molécules biologiques. Leur intégration dans des systèmes microfluidiques favorise la miniaturisation des dispositifs, la réduction des volumes d'échantillons et l'automatisation des analyses. Toutefois, le développement de ce type de plateforme reste un défi technologique qui requiert l'interaction de plusieurs disciplines incluant la biologie, la chimie de surface, la physique et l'ingénierie. En effet, les performances des biocapteurs dépendent de nombreux paramètres, tels que la qualité de fonctionnalisation de surface pour l'immobilisation des biorécepteurs, la stabilité biologique, l'efficacité des

interactions biologiques dans un système fluidique ou encore la sensibilité de la méthode de transduction. C'est pourquoi le développement de plateformes combinant culture cellulaire avancée et analyse intégrée des sécrétions demeure un enjeu scientifique et technologique. Dans ce cadre, le projet de cette thèse vise à développer une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur optique en silicium basé sur la détection de fluorescence, pour une intégration future dans un système complet associant la culture d'organoïdes de pancréas et le suivi de leurs sécrétions.

Ce manuscrit de thèse est structuré en 5 chapitres. Le chapitre I présente le contexte de développement des organoïdes-sur-puce et s'intéresse plus particulièrement aux méthodes d'analyse de ces modèles *in vitro*, en mettant en évidence leurs limitations. Des solutions d'analyse automatisée sont présentées et en particulier les biocapteurs. Les défis technologiques associés à leur développement sont ensuite introduits avant de poser la problématique de thèse. Le chapitre II décrit l'ensemble des procédés expérimentaux et instruments utilisés lors de cette thèse pour développer la plateforme optofluidique. Le chapitre III est consacré à la conception et à la caractérisation du système microfluidique intégrant un biocapteur optique. Le chapitre IV présente le développement et l'optimisation du protocole de biodétection associé à la plateforme optofluidique, ainsi qu'une première preuve de concept pour la détection d'insuline. Le dernier chapitre porte sur le développement d'une fonctionnalisation de surface éco-responsable développée au cours de cette thèse. Pour terminer ce manuscrit, une conclusion générale et les perspectives de cette thèse sont présentées.

Chapitre I

Laboratoires-sur-puce pour le suivi de sécrétions d'organoïdes

Introduction

Ce premier chapitre présente le contexte du développement des sphéroïdes et des organoïdes. Ces modèles cellulaires tridimensionnels sont devenus des outils *in vitro* qui reproduisent plus fidèlement diverses fonctionnalités biologiques. Après un aperçu de leurs caractéristiques et de leurs méthodes de culture traditionnelles, le chapitre présente les contributions apportées par la microfluidique pour l'amélioration du contrôle du microenvironnement des cultures d'organoïdes. Ces nouveaux modèles d'études plus complexes mettent en évidence le besoin de développer de nouvelles méthodes d'analyse, notamment avec l'intégration de biocapteurs. La dernière partie de ce chapitre est ainsi consacrée aux principes de fonctionnement des biocapteurs ainsi qu'au développement de plateformes combinant culture et analyse d'organoïdes-sur-puce.

I.1 Sphéroïdes et organoïdes : nouveaux modèles d'étude *in vitro*

L'amélioration des modèles biologiques *in vitro* constitue un enjeu central en recherche biomédicale et en développement thérapeutique. Dans ce contexte, les organoïdes et sphéroïdes ont émergé comme des modèles prometteurs. Cette section présente le cadre scientifique ayant conduit à leur émergence ainsi que leurs principes fondamentaux et les méthodes permettant leur développement.

I.1.1 Contexte et limitations des modèles biologiques pour la recherche et la médecine

Pour évaluer la pertinence de molécules candidates dans le développement d'un nouveau médicament ou traitement, la phase préclinique constitue la première étape du processus et repose sur deux approches successives : la culture cellulaire suivie des expérimentations animales.

La culture cellulaire en deux dimensions (2D) est un outil essentiel. Simple, économique, et reproductible, elle permet le criblage de molécules et une première étude de la toxicité. Cependant cette méthode est vite limitée pour la suite du processus d'évaluation des candidats médicaments car cette culture en 2D ne peut simuler l'organisation cellulaire, les interactions cellule-cellule ou cellule-environnement et le microenvironnement présents *in vivo*.

Un grand nombre d'études précliniques poursuivent la validation de leur candidat thérapeutique via des expérimentations animales, obligatoires pour passer en phase clinique. Ces tests sont effectués sur un organisme complet pour évaluer l'effet du médicament sur les organes ainsi que son assimilation et son élimination par l'organisme. Tout comme la culture cellulaire en deux dimensions, les modèles animaux restent éloignés de l'humain avec une physiologie et un génome différents du nôtre. Pour autant, ce sont les meilleurs modèles disponibles en termes de complexité pour la sélection de médicaments en phase préclinique. Néanmoins, cette validation n'est pas suffisante pour écarter l'inefficacité et surtout la toxicité des candidats sur le corps humain car on estime à 90 % le taux d'échec en phase clinique [1].

Dans de rares cas, des médicaments très prometteurs, ayant franchi avec succès les phases précliniques et parfois même les premières phases cliniques, sont écartés en raison d'effets secondaires détectés tardivement. C'est le cas du Torcetrapib, développé par Pfizer pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Son développement a été interrompu en phase clinique III à cause d'une surmortalité présente chez les patients traités et après un investissement de près d'un milliard de dollars. Cet échec illustre la difficulté des modèles précliniques à prédire des effets complexes, tels que ceux impliqués dans la régulation de la pression artérielle et qui reposent sur des interactions dynamiques entre plusieurs organes. Dans ce contexte, l'intégration de modèles intermédiaires d'origine humaine, capables de reproduire partiellement la complexité des organes et leurs interactions, pourrait améliorer la sélection des candidats médicaments, en complément des études traditionnelles, tout en réduisant les coûts et les expérimentations animales, particulièrement coûteuses et complexes à mettre en œuvre en termes d'infrastructures et de réglementations.

À ces contraintes s'ajoutent des questions d'usage et d'éthique de plus en plus considérées par l'opinion publique, mais également par les chercheurs et les gouvernements, notamment avec l'interdiction totale de la vente et de l'importation de produits cosmétiques testés sur des animaux à partir de 2013 pour les pays de l'Union européenne [2]. En 2021, le Parlement européen a également voté en faveur d'un plan d'action pour mettre fin à toutes les expériences sur les animaux et qui appelle à accélérer l'innovation scientifique sans utiliser d'animaux dans la recherche, les tests réglementaires et l'enseignement. Ces nouvelles réglementations montrent d'autant plus le besoin urgent de développer de nouveaux modèles d'étude en complément des procédures actuelles.

Finalement, bien que la culture cellulaire et les tests sur animaux aient permis le développement de nombreux médicaments et restent essentiels comme méthodes de validation, leurs limites justifient le développement de nouveaux modèles *in vitro* plus représentatifs de la physiologie humaine.

I.1.2 Les sphéroïdes et organoïdes pour une approche tridimensionnelle de la culture cellulaire

i. Définitions et caractéristiques des sphéroïdes et organoïdes

La culture cellulaire en trois dimensions a fait ses premières apparitions dans les années 1970 et s'est largement développée depuis les années 2000. Elle permet de dépasser certaines limitations de la culture cellulaire en 2D, en offrant des modèles physiologiquement plus pertinents et plus proches des conditions *in vivo*. Nous pouvons retrouver deux principaux modèles de culture en 3D : les sphéroïdes et les organoïdes.

Les sphéroïdes sont des agrégations d'un ou plusieurs types cellulaires se regroupant spontanément en amas sphériques. Ces cellules proviennent la plupart du temps de lignées cellulaires immortelles [3], [4], ou de cellules primaires isolées. Les sphéroïdes sont des modèles simples, ce qui leur a permis de devenir les systèmes 3D les plus répandus pour la caractérisation biophysique et biochimique des interactions intercellulaires de base [5]. Ils offrent la possibilité d'explorer un large spectre de paramètres biophysiques et biochimiques clés tels que les interactions cellule-cellule, l'impact des gradients de nutriments et d'oxygène. Les sphéroïdes sont largement utilisés en recherche oncologique [6], pour le criblage de médicaments [7], l'étude de la résistance aux traitements [8] et les tests de toxicité [9].

Bien qu'il n'existe pas de définition officielle, le terme « organoïde », issu de la combinaison du mot « organe » et du suffixe « -oïde », signifie étymologiquement « ce qui ressemble à un organe » [10]. Introduit pour la première fois en 1940, ce terme a été utilisé de manière sporadique jusqu'à sa réintroduction marquante en 2009, dans un article décrivant le développement tridimensionnel de cellules intestinales différenciées à partir de cellules souches et capables de s'auto-organiser [3], [11]. Aujourd'hui, les organoïdes désignent des cultures en trois dimensions de plusieurs types de cellules spécifiques d'un organe, différenciées à partir de cellules souches embryonnaires, adultes ou pluripotentes induites. Ces structures ont la capacité de s'auto-organiser dans l'espace et peuvent imiter *in vitro* certaines fonctionnalités et mécanismes des tissus ou des organes *in vivo* [3], [10], [12]. Les

organoïdes sont donc plus complexes que les sphéroïdes et offrent une représentation plus fidèle de l'organisation et des fonctions des tissus humains, ouvrant la voie à des avancées majeures en médecine régénérative, en modélisation de maladies et en médecine personnalisée [13]. Dans ce contexte, les modèles d'organoïdes et de sphéroïdes sont générés à partir d'une biopsie ou d'un prélèvement tumoral de patient, permettant ainsi de conserver leurs caractéristiques génétiques et phénotypiques et de réaliser des tests pharmacologiques ciblés afin d'évaluer la sensibilité ou la résistance de la pathologie aux traitements. En cancérologie en particulier, l'utilisation d'organoïdes serait un outil puissant pour offrir au patient le traitement le plus efficace en éliminant les thérapies incompatibles [14]. Plusieurs modèles d'organoïdes ont été développés, tels que les organoïdes de pancréas, de cerveau, de poumon ou encore d'intestins. Par rapport aux sphéroïdes, le développement d'organoïdes est plus complexe, ainsi que la composition cellulaire de ses tissus. En effet, il y a plusieurs étapes de culture utilisant des facteurs de différenciation très spécifiques pour la différenciation des cellules et leur auto-organisation. Ce sont des protocoles longs et coûteux et qui ne sont pas toujours parfaitement maîtrisés [7].

Ainsi les sphéroïdes et les organoïdes constituent deux stratégies distinctes mais complémentaires pour la modélisation tridimensionnelle des tissus *in vitro*. Le choix entre ces deux modèles dépend des objectifs scientifiques visés et du niveau de complexité requis. Dans les deux cas, la culture d'organoïdes et de sphéroïdes diffère des méthodes traditionnelles en deux dimensions et apporte une meilleure modélisation de la morphologie et de la fonctionnalité des organes et tissus cibles.

ii. Culture de sphéroïdes et d'organoïdes : méthodes et limitations

Les cultures cellulaires en trois dimensions peuvent être réalisées avec et sans matrice extracellulaire. Les cultures sans matrice reposent sur des techniques simples utilisant des forces mécaniques ou la gravité afin d'agréger les cellules entre elles. Ils peuvent être produits ensemble ou de manière isolée à l'aide de plaques à puits, de plaques à micro-motifs, de champ magnétique ou de la technique de la goutte suspendue, le « hanging drop » [3]. Les matrices extracellulaires artificielles, qui imitent la matrice extracellulaire présente dans les tissus animaux, sont souvent composées d'hydrogels biologiques tels que le Matrigel [15]. Elles fournissent un support, favorisant l'auto-organisation des cellules, leur différenciation et le maintien de leurs fonctions dans un microenvironnement [3].

Ces méthodes de culture cellulaire en condition statique, bien que très intéressantes pour le criblage et la parallélisation, montrent cependant plusieurs limitations. En effet, il est difficile de changer le milieu de culture des organoïdes, de contrôler précisément l'apport de nutriments et d'éliminer les déchets sans amener de perturbations dans l'équilibre de la culture cellulaire [16], [17]. La formation *in vitro* des sphéroïdes et des organoïdes repose principalement sur l'auto-assemblage aléatoire ou l'auto-organisation. Or *in vivo,* de nombreux stimuli, tels les gradients chimiques et mécaniques, agissent directement sur le développement des cellules [18]. Un bilan de cette partie est présenté sur la Figure I.1.

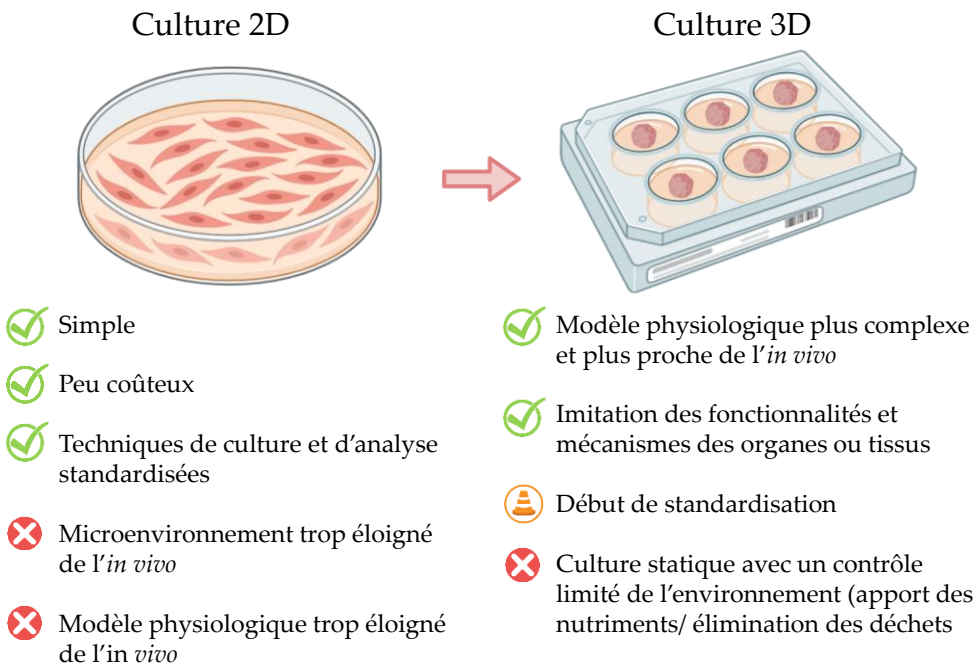


Figure I.1 : Bilan – Le passage de la culture en 2D à la culture en 3D a permis de développer des modèles physiologiques plus complexes, mais leur culture dans des conditions statiques ne reproduit pas fidèlement l'environnement dynamique des tissus in vivo. Créé avec BioRender.com

Passer d'une culture en 2D à une culture en 3D a permis de complexifier les modèles *in vitro*. Toutefois, les méthodes de culture conventionnelles ont montré leurs limites, notamment en termes de contrôle du microenvironnement cellulaire. Afin d'offrir un micro-environnement plus proche de ces conditions physiologiques, la culture d'organoïdes a été associée aux technologies microfluidiques, capables de contrôler précisément l'écoulement de fluides et d'imiter l'environnement mécanique des tissus. Cette approche a donné naissance aux organoïdes-sur-puce, des plateformes *in vitro* permettant la production d'organoïdes standardisés et leur culture dans des conditions dynamiques grâce à l'utilisation de la microfluidique. [16], [19], [20], [21].

I.2 La Microfluidique pour la culture cellulaire 3D : les organoïdes-sur-puce

Cette partie présente les principes de la microfluidique et les principales opérations de manipulation associées. Elle met également en évidence l'intérêt de ces systèmes, dynamiques et miniaturisés, pour reproduire le microenvironnement cellulaire *in vivo* grâce au contrôle précis des paramètres physico-chimiques.

I.2.1 La microfluidique : technologies et avantages

i. La microfluidique, la science des fluides à l'échelle micrométrique

À l'interface entre la physique, la chimie, les sciences du vivant et l'ingénierie, la microfluidique est la science de la manipulation des fluides à l'échelle micrométrique. Dans un système microscopique tel que des microcanaux, les fluides se comportent différemment

de ce qu'on peut observer à l'échelle macroscopique. En effet, les forces physiques qui dominent les écoulements à cette échelle ne sont pas les mêmes. L'un des paramètres fondamentaux pour décrire ces comportements est le nombre de Reynolds (Re), défini comme le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses pour un écoulement unidimensionnel selon la formule suivante [22] : [22]

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu}$$

Où ρ est la densité du fluide, v la vitesse de l'écoulement, L la dimension caractéristique du canal, et μ la viscosité dynamique. Dans les dispositifs microfluidiques, la faible valeur de L (de 100 nm à 1 mm) ainsi que la vitesse modérée des écoulements conduisent à des valeurs de Re très basses, généralement inférieures à 2000, ce qui rend les écoulements laminaires. La Figure I.2-A représente ce type d'écoulement, les lignes de courant (en bleu) dans le canal sont parallèles et régulières. Le fluide se déplace en couches ordonnées sans mélange convectif. Le profil de vitesse d'un écoulement laminaire est parabolique avec une vitesse maximale au centre du canal et nulle aux parois, contrairement à un écoulement turbulent, dont les lignes de courant sont désordonnées, comme le représente la Figure I.2-B, avec des tourbillons dans les canaux, ce qui amène un important mélange convectif entre les couches. Un régime laminaire permet donc de créer des conditions expérimentales très contrôlées. Les fluides circulent en couches parallèles, avec un mélange convectif transversal limité (diffusion), ce qui conduit à une cinétique hautement prévisible.

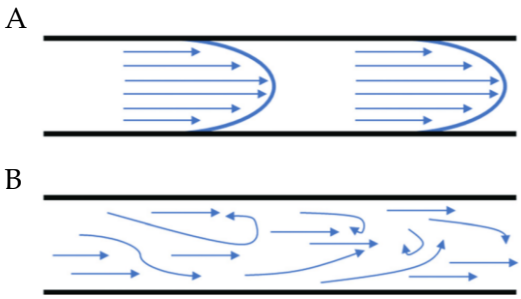


Figure I.2 : Comparaison entre un écoulement laminaire et un écoulement turbulent dans un canal (représenté par les lignes noires), A- Écoulement laminaire, les lignes bleues dans le canal représentent les lignes de courant de l'écoulement, elles sont parallèles et régulières. Le profil de vitesse est parabolique, représentatif de ce type d'écoulement. B- Écoulement turbulent, les lignes de courant sont désordonnées, représentant parfois des tourbillons caractéristiques de ce type d'écoulement. [23]

Dans les systèmes macroscopiques, les forces volumiques telles que l'inertie ou la gravité dominent généralement le comportement des écoulements. Lorsque les dimensions sont fortement réduites dans les microcanaux, les forces de surface, en particulier la tension de surface et la capillarité, deviennent prépondérantes et permettent le contrôle précis des fluides dans les dispositifs microfluidiques [24]. De nombreuses opérations fluidiques ont ainsi été développées, telles que le mélange homogène de fluides avec des structures géométriques spécifiques comme les serpentins [25], [26], la génération de gouttelettes pour l'encapsulation

de cellules ou la réalisation de réactions isolées [27], [28], ainsi que la séparation et le tri cellulaire [29], [30].

Ces propriétés permettent de réduire significativement les volumes de réactifs et d'échantillons et ouvrent la voie à la miniaturisation et à l'automatisation de protocoles biologiques ou chimiques. Elles ont ainsi favorisé l'émergence des laboratoires-sur-puce (Lab-on-Chip ou LOC). Également désignés sous l'acronyme µTAS (micro Total Analysis System), ces dispositifs miniaturisés intègrent plusieurs fonctions analytiques ou biochimiques sur une seule plateforme. Automatisés, portables et économiques comparés aux installations traditionnelles, ils sont particulièrement adaptés à des contextes de diagnostics décentralisés ou d'analyses sur le terrain. Ces dispositifs trouvent des applications dans de nombreux domaines, notamment le domaine environnemental pour la détection et la surveillance des polluants dans l'air, l'eau et les sols [31], [32], dans le secteur agroalimentaire, à travers des tests rapides pour la sécurité alimentaire avec la détection de contaminants [33], [34], dans le domaine médical pour la détection rapide de pathogènes ou de biomarqueurs spécifiques, mais aussi en pharmacologie avec le criblage à haut débit et la formulation de médicaments [35], [36], [37].

ii. Matériaux pour la fabrication des Lab-on-chip

Une grande majorité des systèmes microfluidiques développés en laboratoire sont fabriqués à partir de polydiméthylsiloxane (PDMS), un élastomère à base de silicone. Le verre et les thermoplastiques tels que le Poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) ou le Copolymère Oléfine Cyclique (COC) sont également des matériaux utilisés pour réaliser ces systèmes. La Figure I.3 présente les différents avantages et inconvénients de ces 3 types de matériaux. Le choix du matériau dépend donc de la compatibilité de ces propriétés avec l'application visée mais aussi avec la technologie microfluidique sélectionnée pour le contrôle des fluides.

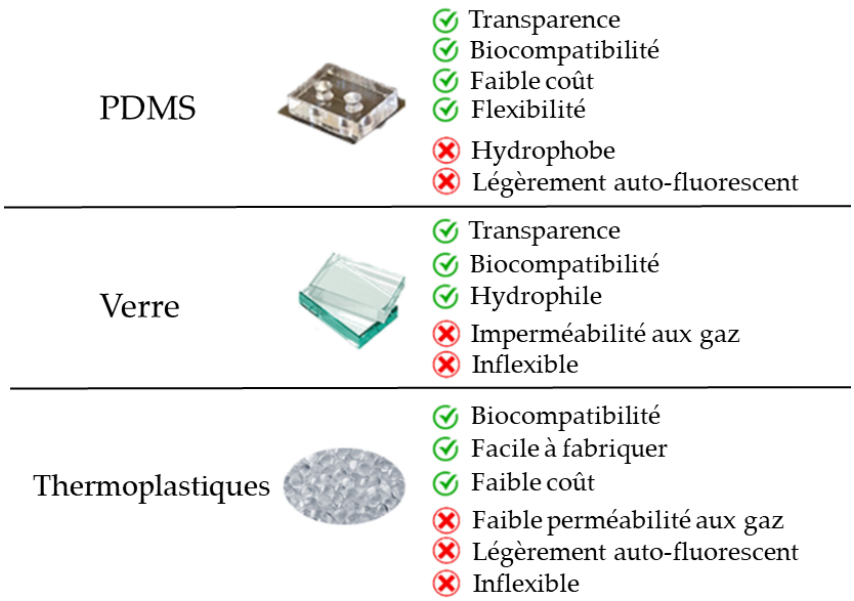


Figure I.3 : Les trois matériaux les plus utilisés pour fabriquer des puces microfluidiques et leurs caractéristiques, adapté de la publication de Tajeddin et al. [38].

I.2.2 Techniques de contrôle de flux en microfluidique

Il existe de nombreuses stratégies pour contrôler le déplacement des fluides dans des systèmes microfluidiques. Nous pouvons séparer ces méthodes d'actionnements en deux catégories : les méthodes passives et les méthodes actives.

i. Microfluidique passive

Dans une approche passive, les fluides sont déplacés sans source d'énergie externe. Les techniques microfluidiques passives peuvent utiliser des forces telles que la gravité, la capillarité, la tension de surface, l'osmose, le vide ou la pression, sans actionnement d'éléments actifs [39]. Ces mécanismes passifs permettent le développement de dispositifs peu coûteux, faciles à fabriquer et simples d'utilisation grâce à leur autonomie. Cela en fait des outils essentiels pour un fonctionnement sur le terrain au plus proche de l'utilisateur [40]. Cependant le contrôle limité du débit, l'utilisation souvent à usage unique pour des tâches simples, la dépendance aux propriétés des fluides ou des surfaces empêchent de développer des systèmes passifs intégrant des protocoles complexes multi-étapes robustes [39], [41]. Les techniques passives sont donc peu adaptées au développement des organoïdes-sur-puce qui nécessite un suivi en continu, idéalement sur plusieurs jours.

ii. Microfluidique active

Dans une approche active, des sources d'énergies externes sont utilisées pour contrôler les fluides. Il existe plusieurs méthodes présentées dans le tableau I-2 ci-dessous :

Technique	Avantages	Limitations
Électro-osmose (Champ électrique) [42], [43]	Génère un flux continu sans pulsation, idéal pour la précision. Capable de pomper des solvants aqueux et organiques. Miniaturisation.	Fiabilité encore limitée, surtout pour un usage long terme ou avec des fluides variés, donc peu d'industrialisation par manque de robustesse.
Acoustofluidique (ondes ultrasonores) [44]	Méthode sans contact pour manipuler des particules et actionner des fluides précisément. Très bonne biocompatibilité.	Des instruments spécialisés qui nécessitent des opérateurs hautement qualifiés. Besoin d'équipements externes : générateurs de fonctions, amplificateurs. Manque de robustesse et d'automatisation.
Microfluidique centrifuge (rotation d'un disque) [45]	Contrôle rapide des fluides et dispositifs portables adaptés pour une utilisation terrain.	Technologie de traitement de haute précision pour la fabrication des composants. Système complexe pour une rotation précise. Dispositifs majoritairement à usage unique.

Microfluidique par actionnement mécanique (pousse-seringue, pompe péristaltique) [32], [47], [40]	Mise en œuvre simple et large disponibilité de dispositifs commerciaux. Contrôle précis du débit.	Vitesse et volumes limités par le remplissage des seringues. Volumes morts entraînant la perte d'échantillon. Difficulté pour la parallélisation des analyses. Risque important de contamination nécessitant une maintenance importante. Dispositifs encombrants.
Microfluidique par actionnement pneumatique (air comprimé) [48]	Dispositifs commerciaux. Contrôle précis du débit.	Encombrement dépendant du type compresseurs. Peut limiter la miniaturisation et la portabilité d'un système.

Tableau I-1 : Avantages et inconvénients des méthodes actives d'actionnement de fluide.

Pour les organoïdes-sur-puce, la majorité des dispositifs utilisent des méthodes d'actionnement actives principalement à l'aide de pousse-seringue ou de pompe péristaltique, utilisés en raison de leur utilisation simple et de leur capacité à contrôler précisément les débits. Elles permettent d'assurer la perfusion et le maintien des cultures dans des conditions reproductibles. Pour développer des protocoles biologiques complexes nécessitant la gestion de plusieurs réactifs, ces méthodes d'actionnement doivent être combinées à des systèmes de vannes permettant de diriger les flux.

iii. Déplacement dirigé des fluides

Il existe des composants microfluidiques, appelés vannes ou micro-vannes, conçus pour contrôler le passage et la direction des fluides dans les microcanaux. Elles permettent d'ouvrir et de fermer les canaux au passage des fluides ou d'isoler les réactifs les uns des autres. Elles sont essentielles dans le développement de protocoles complexes, souvent composés de plusieurs séquences d'injections de différents fluides. Ces vannes doivent respecter certaines caractéristiques, comme avoir une étanchéité élevée, un faible volume mort et une réponse rapide. Elles jouent également un rôle central dans la programmation et l'automatisation des opérations fluidiques telles que les mélanges, les séparations et la distribution des fluides [48].

Comme pour les méthodes d'actionnement des fluides, elles peuvent fonctionner de manière passive ou active. Les vannes passives exploitent uniquement les propriétés physiques des canaux, des matériaux et des fluides. Elles fonctionnent notamment grâce à des phénomènes tels que la capillarité, la tension de surface ou la gravité [49]. Ces vannes, s'ouvrant ou se fermant en fonction de conditions physiques précises, sont très souvent à usage unique. Une fois le seuil de déclenchement franchi, la vanne ne peut revenir dans son état initial. Les vannes passives sont très intéressantes pour les dispositifs à usage unique de type Point-of-Care afin de séquencer les actions des fluides pendant les étapes du test sans avoir recours à des instruments externes.

Les vannes actives ont besoin d'une source d'énergie externe pour fonctionner, comme une force électromagnétique, gazeuse, thermique, etc. Elles sont souvent plus précises, réversibles avec une bonne répétabilité, mais sont également plus complexes et peuvent tout de même finir par s'user. On peut citer comme vannes actives celles présentes dans le Tableau I-2.

Type de vanne	Principe de fonctionnement	Avantages	Limitations
Électrovannes (Figure I.4-A)	Actionnement électromagnétique : un courant électrique génère un champ magnétique qui déplace un noyau magnétique ou déforme une membrane pour ouvrir ou fermer le microcanal.	Contrôle direct et fiable du débit. Réponse rapide. Technologie bien maîtrisée.	Encombrement important. Intégration limitée dans des dispositifs fortement miniaturisés.
Vannes électro-mouillantes (Figure I.4-B)	Modulation de la mouillabilité d'une surface par application d'une tension électrique modifiant les propriétés hydrophile/hydrophobe du substrat.	Absence de pièces mécaniques mobiles. Bonne précision de contrôle. Forte miniaturisation possible.	Nécessite un contrôle électrique précis. Sensibilité aux propriétés de surface et aux conditions physicochimiques du fluide.
Vannes thermiques (Figure I.4-D)	Utilisation de matériaux thermosensibles (cire, alliages à mémoire de forme, hydrogels) qui se dilatent, se contractent ou changent de phase sous l'effet de la température pour bloquer ou libérer le canal.	Intégration facilitée. Absence de mécanisme mobile complexe.	Temps de réponse souvent plus lent. Sensibilité aux variations de température environnementale.
Vannes acoustiques (Figure I.4-E)	Utilisation d'ondes acoustiques générées par des transducteurs piézoélectriques pour créer des gradients de pression capables de piéger, dévier ou libérer les fluides.	Méthode sans contact mécanique direct. Manipulation rapide et précise des fluides et particules. Bonne biocompatibilité.	Nécessite des dispositifs piézoélectriques intégrés. Contrôle précis des fréquences et amplitudes requis.
Vannes pneumatiques (Figure I.4-C)	Déformation d'une membrane élastomère (souvent PDMS) sous l'effet d'une pression d'air ou de gaz appliquée dans un canal pneumatique.	Rapide, robuste et facilement intégrable dans des réseaux microfluidiques complexes.	Nécessite des sources de pression externes. Complexité accrue de l'instrumentation périphérique.

Tableau I-2 : Présentation du fonctionnement de différents types de vannes microfluidiques ainsi que de leurs avantages et limitations.

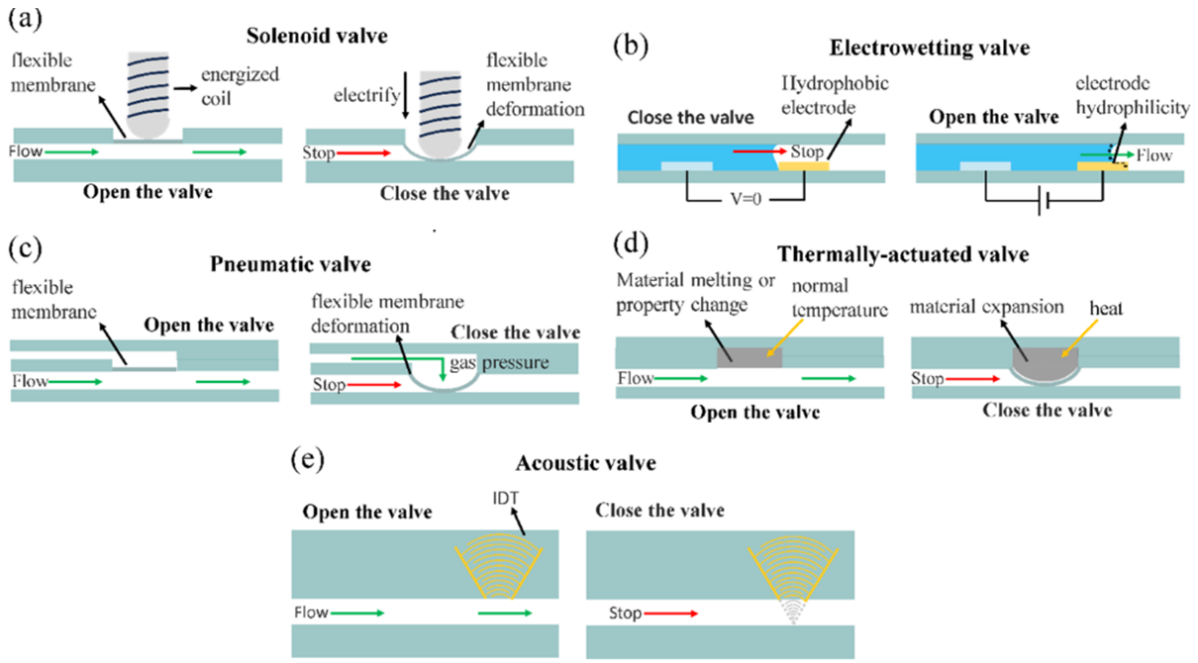


Figure I.4 : Vue schématique des différents types de vannes actives A- Électrovanne, B -Vanne électromouillante, C- Vanne pneumatique, D- Vanne thermique, E- Vanne acoustique. [48]

Les vannes actives, quel que soit leur type, jouent un rôle important dans le développement de systèmes microfluidiques programmables, indispensables pour l'automatisation de protocoles microfluidiques complexes. Parmi ces méthodes, les vannes pneumatiques ont l'avantage de pouvoir utiliser une seule source de pression pour contrôler un grand nombre de vannes simultanément, contrairement aux vannes mécaniques ou thermiques qui nécessitent une mise en place plus complexe, augmentant l'encombrement et la complexité des systèmes.

I.2.3 La microfluidique pour l'étude de modèles cellulaires *in vitro* plus avancés

Dans le prolongement des laboratoires-sur-puce, une autre déclinaison possible de la microfluidique a fait son apparition : le développement de systèmes microphysiologiques avec un microenvironnement contrôlé, plus connus sous le nom d'organes-sur-puce (Organ-on-Chip, OoC). Ces dispositifs microfluidiques visent à mimer les fonctions biologiques spécifiques d'organes humains comme le foie, le poumon, l'intestin ou encore le cœur, en intégrant des cellules vivantes dans des microstructures tridimensionnelles. Ils peuvent accueillir différents modèles biologiques comme les sphéroïdes et les organoïdes présentés précédemment, mais aussi des explants, fragments de tissu prélevés sur un organisme vivant (biopsie ou prélèvement post-mortem). La combinaison de ces modèles biologiques avec les technologies microfluidiques bénéficie des avantages de cette dernière : contrôle précis de l'environnement, perfusion dynamique de milieu de culture, stimulation mécanique et même vascularisation pour certains modèles. Ces systèmes représentent ainsi des modèles fonctionnels et dynamiques, plus représentatifs de l'*in vivo* que les cultures cellulaires classiques, et ouvrent de nouvelles perspectives en toxicologie, criblage de médicaments, recherche sur les maladies humaines, et médecine personnalisée.

La culture cellulaire tridimensionnelle en systèmes microfluidiques nécessite le développement d'architectures avec des canaux de dimensions et formes différentes qui dépendent du modèle biologique choisi mais aussi des matériaux. Certaines architectures sont fréquemment utilisées telles que les systèmes à canal unique, à double canal ou multicanaux, comme le montre la Figure I.5 [50].

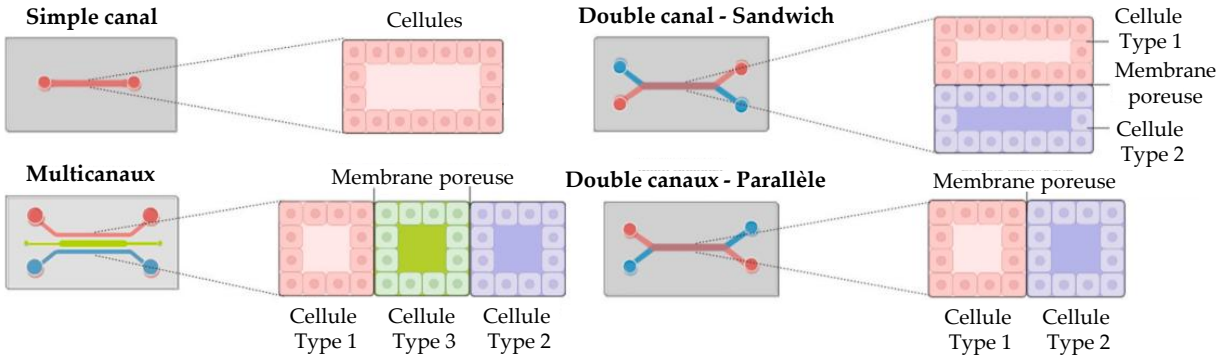


Figure I.5 : Schéma d'architecture de systèmes microfluidiques pour la culture d'organes-sur-puce à un, deux ou plusieurs canaux. Une membrane poreuse sépare les canaux entre eux. Différents types cellulaires peuvent être cultivés dans ces puces [50].

Le modèle le plus répandu consiste en deux canaux séparés par une membrane microporeuse ou un compartiment en hydrogel permettant des échanges par diffusion ou par transmigration cellulaire. La face supérieure de la membrane est souvent composée de cellules épithéliales, tandis que des cellules endothéliales ou immunitaires occupent le canal inférieur. Cette configuration permet de recréer plusieurs types d'interfaces fonctionnelles comme une interface intestin/vaisseaux, alvéoles pulmonaires/capillaires, barrière hémato-encéphalique [51], [52], [53]. Les systèmes à trois canaux représentent des systèmes plus complexes. Le canal central**,** souvent rempli de matrice extracellulaire (ECM) en hydrogel, peut parfois héberger un tissu 3D (ex : tumeur, sphéroïde, tissu vasculaire) ou des cellules. Les canaux latéraux peuvent servir à perfuser des cellules (endothéliales, épithéliales, immunitaires, stromales), du milieu de culture ou des traitements. Ces dispositifs permettent une culture tridimensionnelle et la modélisation d'interactions complexes [54], [55]. De nombreuses autres architectures ont été développées pour s'adapter aux modèles biologiques étudiés, tels que des mini-intestins-sur-puce intégrant les villosités et cryptes présentes *in vivo* [56] ou des poumons-sur-puce reproduisant l'organisation spatiale du tissu pulmonaire [57].

Concernant la culture d'organoïdes ou de sphéroïdes-sur-puce, il existe également d'autres dispositifs microfluidiques. Par exemple, S. T. Seiler et *al.* ont développé une plateforme totalement automatisée en combinant une plaque à puits et un système microfluidique en PDMS composé de 24 puits isolés pouvant accueillir différents types d'organoïdes (Figure I.6) [58]. Chaque puits est connecté par un circuit fluidique qui permet à la fois d'alimenter en nutriments l'organoïde mais aussi d'éliminer ses déchets grâce à un pousse-seringue. Ce système rend possible la culture de 24 organoïdes en parallèle, dans des conditions expérimentales distinctes.

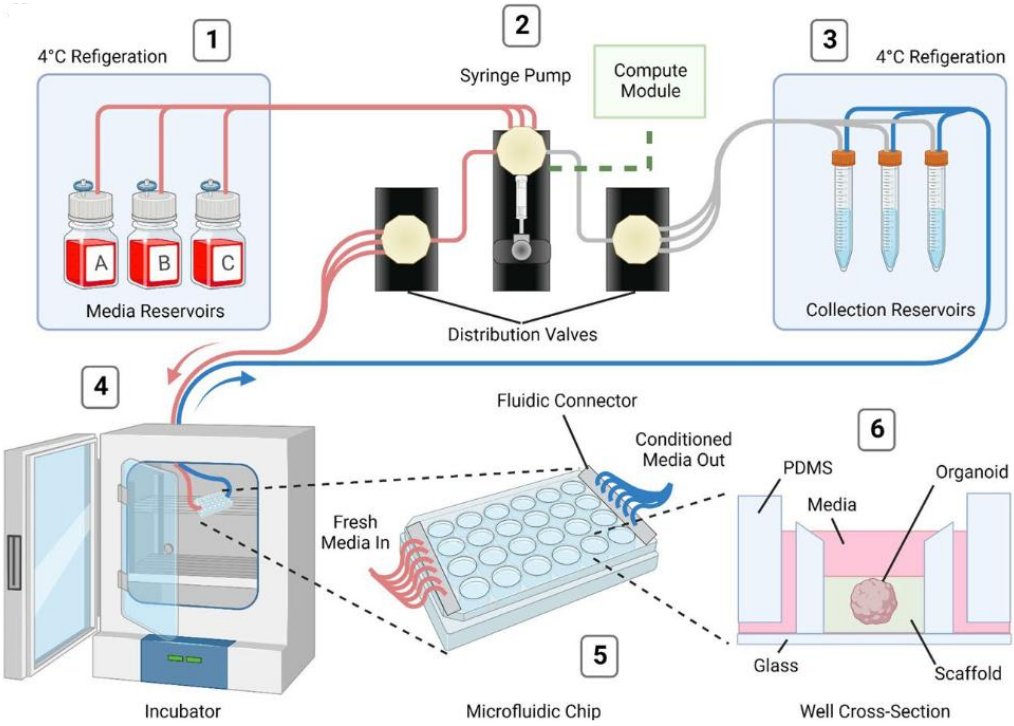


Figure I.6 : Illustration de la plateforme de culture organoïde microfluidique automatisée développée par S. T. Seiler et al. (1) Réfrigérateur pour les réservoirs contenant les réactifs. (2) Pousse-seringue, vannes de distribution et interface de commande. (3) Réfrigérateur avec réservoirs pour la collecte des milieux conditionnés. (4) Les tubes microfluidiques pénètrent dans l'incubateur et sont connectés au système microfluidique à puits (5) à l'intérieur de l'incubateur. (6) Schéma en coupe transversale d'un puits unique contenant une culture d'organoïdes. [16], [58]

D'autres systèmes microfluidiques plus complexes permettent d'isoler dans des pièges pour les trier ou les immobiliser à des endroits précis tout en conservant la possibilité de réaliser des échanges entre les cultures, perfusées efficacement [59], [60]. Cette approche permet une culture haut débit d'organoïdes. Certains modèles vont même jusqu'à la vascularisation des organoïdes.

En effet, la plupart des tissus de plus de 400 µm d'épaisseur ont besoin d'une vascularisation fonctionnelle pour assurer un apport suffisant en nutriments et en oxygène. Elle permet également d'éliminer efficacement le dioxyde de carbone et les déchets cellulaires, évitant ainsi la formation de noyaux nécrotiques internes susceptibles de nuire à la culture. Quintard et *al.* proposent un dispositif microfluidique permettant la vascularisation de divers organoïdes ou sphéroïdes [61]. Le système a été validé avec des sphéroïdes générés à partir de fibroblastes et de cellules endothéliales humaines, et avec des organoïdes vasculaires humains 3D (OVB) générés à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) et de sphéroïdes d'îlots pancréatiques humains. La Figure I.7 présente la puce microfluidique en COC et composée de 10 microcanaux indépendants en serpentin contenant chacun un piège au centre. Un pousse-seringue à 10 canaux est connecté en sortie pour la perfusion des fluides. Ce type de dispositif microfluidique avec la vascularisation a démontré une amélioration de la croissance, de la maturation des organoïdes vasculaires et des fonctionnalités des sphéroïdes d'îlots pancréatiques. Néanmoins, il reste encore peu automatisé comparé à la plateforme de

S. T. Seiler et *al.*, car il nécessite un nombre important d'opérations manuelles, notamment pour le piégeage des organoïdes dans le serpentin. De plus, le renouvellement du milieu de culture est également réalisé manuellement, généralement tous les deux à trois jours, ce qui peut limiter la reproductibilité des expériences et contraindre le passage à des études à plus grande échelle. La vascularisation des organoïdes reste encore un défi de taille pour l'ingénierie tissulaire en 3D.

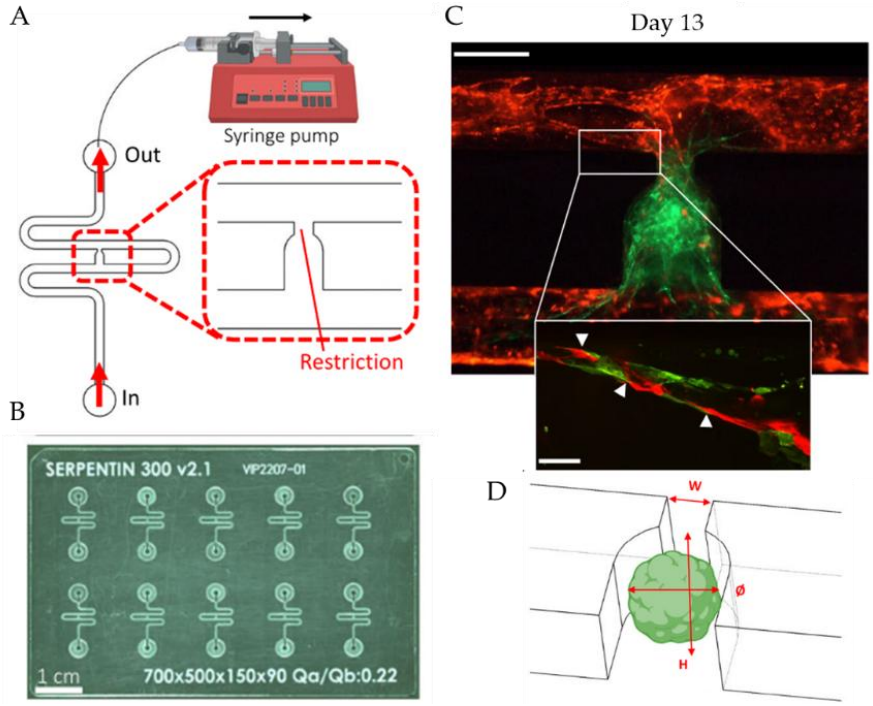


Figure I.7 : Dispositif microfluidique pour la vascularisation de sphéroïdes et organoïdes développé par Quintard et al. A - Vue de dessus du dispositif microfluidique. Un pousse-seringue est connecté à la sortie du canal afin d'aspirer le milieu de culture et de mettre en place la perfusion. B - Photographie de la puce microfluidique composée de 10 micro-canaux avec un site de piégeage chacun. C - Génération de réseaux endothéliaux anastomosés grâce à la vascularisation fonctionnelle de sphéroïdes mésenchymateux qui semblent stables jusqu'à la fin de la période d'observation (13 jours), D - Vue schématique en trois dimensions de la zone en forme de U servant de piège [61]. [60]

Contrairement aux cultures standards, certains systèmes microfluidiques permettent également d'intégrer divers stimuli externes qui influencent le développement et le comportement cellulaire. Des forces de pression, mécaniques ou électriques, peuvent être appliquées pour reproduire les paramètres mécano-physiologiques présents *in vivo*, notamment les contraintes de cisaillement, les flux pulsatifs ou interstitiels, les déformations par étirements ou compression, qui modulent la morphologie, la différenciation et la migration cellulaires. Les contraintes de cisaillement, les flux pulsatifs ou interstitiels dépendent fortement des dimensions des canaux et du type d'actionnement fluidique (pousse-seringue, pompe péristaltique…), [60], [62], [63], [64].

Comme nous venons de le voir, la microfluidique apporte de nombreuses améliorations pour la culture et l'étude des modèles cellulaires en trois dimensions et devient un outil précieux pour développer ces cultures. Depuis une quinzaine d'années, la

commercialisation de modules microfluidiques prêts à l'emploi a fait son apparition avec des entreprises comme Emulate, InSphero ou encore TissUse.

Néanmoins, ces modèles présentent encore certaines limitations, notamment pour le criblage à haut débit, qui reste moins performant que les approches classiques en plaques à puits. L'utilisation majoritaire du PDMS, malgré ses nombreux avantages (élasticité élevée, faible coût, bonne transparence optique, bonne pénétration de l'oxygène et biocompatibilité), pose problème avec l'absorption de petites molécules hydrophobes, pouvant affecter l'efficacité du criblage de médicaments [65], [66]. Bien que ce matériau soit adapté au prototypage, son industrialisation reste encore complexe à mettre en place [67].

Les modèles de recherche les plus complexes doivent encore se robustifier au niveau de la reproductibilité, de l'automatisation et de la standardisation des protocoles pour être adoptés à grande échelle [13]. Sur le plan réglementaire, l'absence de normes claires ralentit l'acceptation généralisée de ces technologies par l'industrie pharmaceutique, bien que des initiatives internationales visent à définir des standards et des critères d'évaluation inter-laboratoires pour évaluer la fiabilité et la comparabilité des modèles [68]. Un bilan de cette partie est présenté sur la Figure I.8.

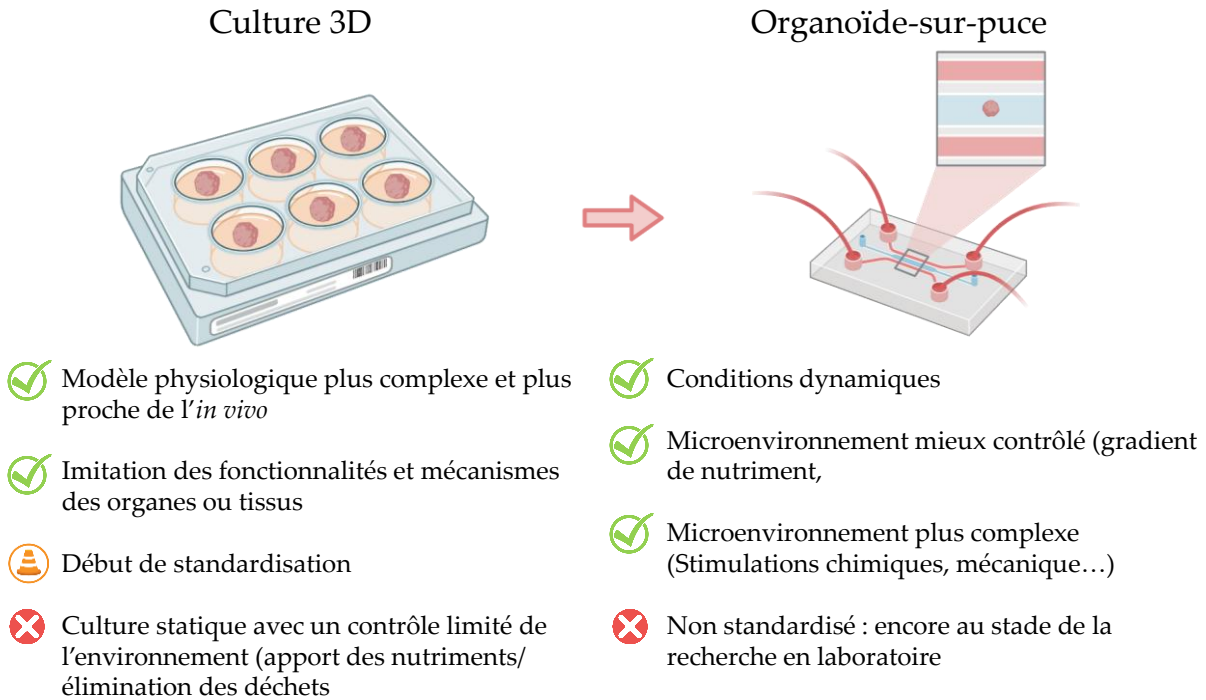


Figure I.8 : Bilan – L'intégration de la microfluidique dans la culture cellulaire 3D a permis d'améliorer les modèles avec des microenvironnements dynamiques plus représentatifs des tissus in vivo. Cependant le manque de standardisation de ces modèles empêche leur utilisation à grande échelle. Créé avec BioRender.com

Dans ce contexte, la complexité croissante de ces modèles rend nécessaire le développement de méthodes d'analyse et de suivi adaptées, permettant leur caractérisation et leur validation. La section suivante présente les principales approches utilisées pour le suivi des organoïdes et des sphéroïdes, afin d'en évaluer les performances et d'identifier les limites.

I.3 Techniques d'analyse et de suivi des organoïdes et sphéroïdes

I.3.1 Méthodes analytiques conventionnelles

La culture d'organoïdes et de sphéroïdes nécessite de contrôler et de suivre un certain nombre de paramètres comme l'oxygène, la température et le pH, afin de maintenir la qualité de la culture. De plus, pour évaluer la viabilité et la fonctionnalité du modèle cellulaire, d'autres paramètres peuvent être caractérisés tels que la sécrétion de molécules spécifiques (présence et concentration), les caractéristiques morphologiques et morphocinétiques (forme, taille, prolifération cellulaire) [69], [16]. L'analyse et le suivi de ces paramètres doivent permettre de mieux comprendre les interactions cellules-cellules, la réponse aux stimuli ou encore l'impact de certaines substances. Actuellement, la détection et la quantification des métabolites ou des protéines sécrétés comme les cytokines reposent encore principalement sur la microscopie optique et des technologies d'analyse hors puce (off-chip) telles que les immunodosages ou encore les méthodes d'analyse du matériel génétique [70].

i. Microscopie optique

La microscopie optique est une méthode analytique puissante et très répandue pour observer le développement des organoïdes. Il existe plusieurs techniques d'imagerie telles que l'imagerie en champ clair (Bright Field), en épifluorescence, la microscopie biphoton et épifluorescence biphoton ou encore confocale, permettant d'étudier de nombreux paramètres biologiques tels que la composition et la prolifération cellulaire, l'apoptose (mort cellulaire) ou encore le transport membranaire [71]. Une des plus grandes limitations des méthodes optiques est la nécessité d'utiliser des marqueurs qui peuvent être un facteur d'interférence dans l'interaction cellulaire ou entrainer directement la mort du tissu (fixation et perméabilisation du tissu), ce qui est incompatible avec un suivi dans le temps [72]. Le laser peut également être source de phototoxicité avec une exposition prolongée [73]. L'intégration d'un système de microscopie optique miniaturisé reste encore compliquée à développer, ce qui signifie que de nombreuses analyses sont réalisées avec des appareils volumineux.

ii. Analyse du matériel génétique

L'analyse génomique et transcriptomique sont couramment utilisées dans l'étude des modèles d'organoïdes, notamment pour identifier d'éventuelles mutations génétiques ou pour étudier la différenciation cellulaire. Ces analyses nécessitent souvent une amplification du matériel génétique (ADN ou ARN) afin d'obtenir une quantité suffisante et exploitable pour du séquençage ou de la détection. On peut citer deux méthodes connues pour réaliser une amplification d'ADN : la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). La PCR est une procédure de routine, considérée comme le gold standard de détection d'acides nucléiques. La LAMP, quant à elle, apparue au début des années 2000, est une méthode d'amplification isotherme à une température généralement entre 60 et 65 °C. Cette méthode est très intéressante car sa capacité d'amplification isotherme simplifie la conception de systèmes de détection intégrés portables, notamment en

microfluidique [74]. Pour l'étude des organoïdes, la PCR et la LAMP sont utilisées pour analyser l'expression de gènes [75], [76].

iii. Les immunodosages

Un immunodosage est une méthode analytique utilisée pour détecter, identifier ou quantifier une substance (protéine, hormone, toxine, pathogène, etc.) dans un échantillon biologique. Le principe général est basé sur l'interaction spécifique entre un anticorps et un antigène, correspondant à la molécule cible présente dans l'échantillon. La formation du complexe antigène-anticorps est ensuite convertie en un signal mesurable proportionnel à la quantité d'analyte. Il existe plusieurs formats d'immunodosage. Le format direct repose sur l'utilisation d'un anticorps marqué se liant directement à l'antigène. Le format indirect implique un anticorps primaire spécifique à la cible et un anticorps secondaire marqué spécifique à l'anticorps primaire. Le format sandwich utilise deux anticorps spécifiques, reconnaissant des épitopes distincts de l'antigène. Dans le format compétitif, la molécule cible entre en compétition avec un antigène de référence pour la liaison à l'anticorps. La quantité de complexes détectés est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte [77]. En plus de ces différents formats de capture de l'antigène, il existe plusieurs méthodes de révélation, dont l'immunodosage enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) qui utilise une enzyme couplée à un anticorps générant un signal colorimétrique après ajout d'un substrat (molécule chimiquement réactive à l'enzyme). Les méthodes chimiluminescentes, CLIA (chemiluminescent immunoassay), exploitent une réaction chimique émettant de la lumière sans excitation externe. Les systèmes fluorescents, FIA (fluorescent-linked immunoassay), reposent sur l'émission lumineuse d'un fluorophore excité à une longueur d'onde spécifique. De nombreux immunodosages sont utilisés en routine dans les laboratoires et sont considérés comme des techniques clés pour l'analyse et la caractérisation des organoïdes qui sécrètent de nombreuses molécules comme des cytokines, des facteurs de croissance, des enzymes ou d'autres biomarqueurs présents dans le surnageant [69], [70]. Les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ) d'un immunodosage ne sont pas universelles. Elles dépendent de l'analyte, de l'affinité des anticorps, de la configuration analytique, du système de détection et du milieu de l'échantillon.

iv. Limitations des méthodes conventionnelles

Ces techniques d'analyse conventionnelles offrent une sensibilité et une spécificité d'analyse élevées, mais restent majoritairement limitées à des approches en point final ou multipoints peu compatibles avec un suivi dynamique en temps réel. Leur mise en œuvre peut être longue, invasive et parfois destructive pour les cultures. Elles nécessitent également des manipulations hors systèmes (off-chip), source de variabilité expérimentale. [78], [79]. Pour le suivi des organoïdes et sphéroïdes, nous nous intéressons plus particulièrement à l'analyse des molécules sécrétées par les organoïdes, représentatives de leur « état de santé » et de leur réponse à différents stimuli. Le dosage de ces molécules est donc une étape clé pour la compréhension de ces modèles.

Pour obtenir une détection adaptée, les méthodes analytiques doivent être compatibles avec des volumes d'une centaine de microlitres et des concentrations d'analyte faibles. Elles

doivent aussi réduire les manipulations hors système pour réduire la variabilité expérimentale et préserver la culture sans la perturber. Une intégration au plus proche des cultures permettrait de limiter ces prélèvements et les phénomènes de dilution ou les pertes d'analyte.

L'ensemble de ces critères souligne la nécessité de développer des plateformes analytiques intégrées capables d'assurer simultanément le contrôle du microenvironnement, la culture cellulaire et la détection *in situ*. Dans ce contexte, la miniaturisation et l'automatisation des immunodosages en microfluidique pourraient répondre aux besoins de ces systèmes analytiques intégrés.

I.3.2 Intégration des immunodosages en microfluidique

La technologie des laboratoires-sur-puce s'est imposée comme un outil puissant, notamment pour la détection de biomolécules, en offrant des dispositifs miniaturisés, rapides, sensibles et plus accessibles, capables d'effectuer plusieurs tâches (préparation d'échantillons, détection, analyse…).

Un grand nombre d'immunodosages a été intégré en microfluidique, capables de détecter de manière sensible différents types de biomolécules. Cependant, ces dispositifs se concentrent principalement sur l'intégration du test biologique, cherchant à améliorer sa sensibilité et sa rapidité. Ils utilisent en grande partie la propriété de capillarité pour contrôler leurs réactifs sans instruments externes (pousse-seringue, pompe péristaltique) [80] [81] [82]. L'utilisation de la capillarité présente des limites pour certaines applications, notamment à cause du contrôle limité du débit, du manque de reproductibilité des résultats et de son emploi principalement dans des protocoles simples. Son utilisation pour le suivi des organoïdes ne semble donc pas pertinente. De plus, les systèmes en PDMS couplés à des pousses-seringues ou pompes péristaltiques, très couramment utilisés, restent peu automatisés. Ce sont des dispositifs de recherche encore loin du développement d'instruments compacts, automatisés, robustes et industrialisables. L'intégration complète d'immunodosage reste un enjeu, en plus de l'amélioration de la sensibilité et de la rapidité des tests. Plusieurs chercheurs se sont donc intéressés au développement de plateformes beaucoup plus automatisées.

Plusieurs approches permettent l'automatisation de protocoles biologiques, notamment la microfluidique centrifuge. De nombreux lab-on-a-disc ont été développés afin d'intégrer des protocoles d'immunodosages [83], [84]. Grâce à un actionnement contrôlé des chambres par force centrifuge et à l'utilisation de micro-vannes, ces dispositifs ont la possibilité d'être quasi intégralement automatisés et éliminent le besoin de pompes externes tout en contrôlant le fluide précisément. Cependant l'utilisation de ce type de technologie, comme système d'analyse intégré pour le suivi d'organoïdes, ne semble pas adaptée car les rotations perturberaient potentiellement les cultures.

Récemment, G. Choi et *al.* ont développé une plateforme microfluidique portable avec un module en PDMS pour la détection quantitative de biomarqueurs de maladies inflammatoires dans des échantillons humains (Figure I.9-A) [85]. Le système peut réaliser en 40 minutes, 8 immunodosages sandwich sur billes magnétiques avec une détection par

chimiluminescence. Un actionnement électromagnétique qui déplace un aimant permet de manipuler les billes magnétiques à travers les chambres microfluidiques pour réaliser les étapes d'incubation, de lavage et finalement de détection grâce à un capteur CMOS (Figure I.9). Cet instrument versatile combine sensibilité, automatisation et intégration.

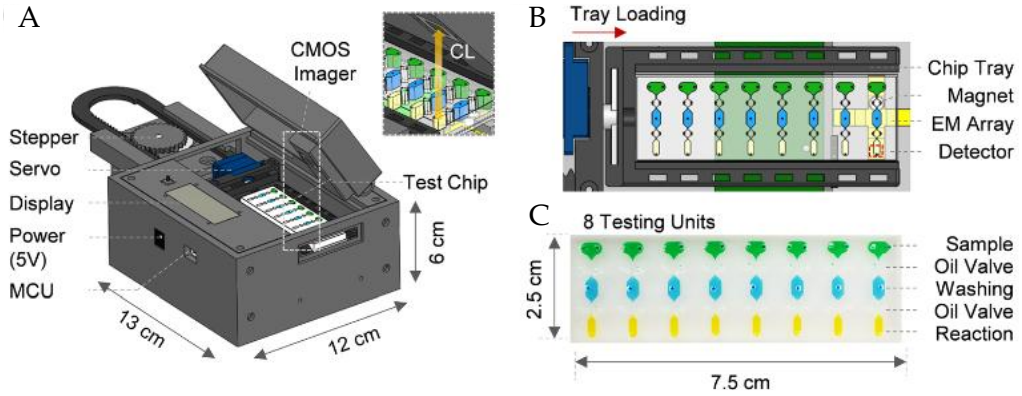


Figure I.9 : Schéma de la plateforme microfluidique développée par Choi et al. pour la détection et la quantification de biomarqueurs de maladies inflammatoires, A- L'imageur CMOS est intégré dans le couvercle, en contact direct avec la puce microfluidique pour la mesure par chimiluminescence, B- Vue schématique du dessus du système microfluidique, C- Photographie de la puce avec ses huit tests indépendants, chacun composé d'une chambre d'échantillonnage, d'une chambre de lavage et d'une chambre de réaction séparées par des valves à huile [85].

Il existe d'autres technologies microfluidiques permettant de développer des dispositifs d'analyse automatisés. Par exemple, Wang et *al.* présentent un dispositif microfluidique portable et totalement automatisé utilisant un système électropneumatique pour manipuler les fluides par aspiration et les diriger à l'aide d'électrovannes, à l'intérieur d'une cartouche microfluidique en acrylique, présenté sur la Figure I.10-A et B [86]. Ce dispositif compact (Figure I.10-C) a permis de réaliser un immunodosage sandwich à billes fonctionnalisées avec la protéine Spike, pour la capture d'anticorps anti-SRAS-CoV-2 et leur détection à l'aide d'anticorps secondaires fluorescents AlexaFluor 488.

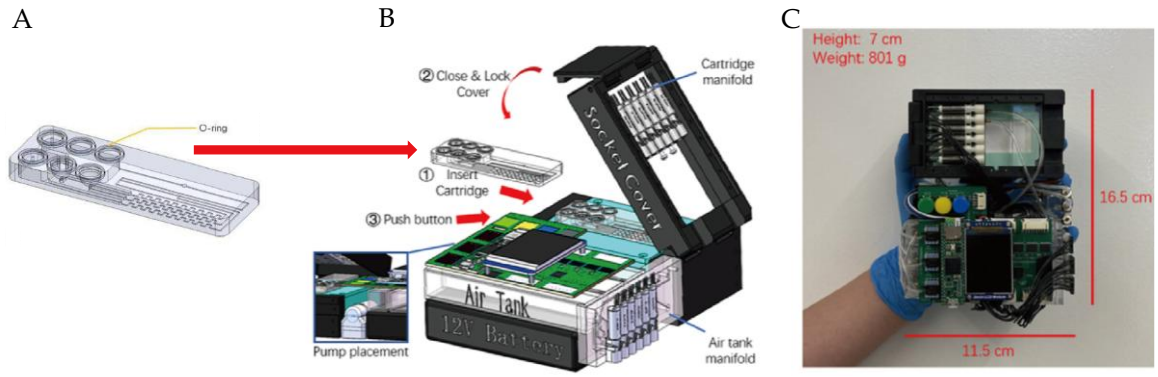


Figure I.10 : Dispositif portable et automatisé développé par Wang et al. pour la détection du SRAS-CoV-2, A-Vue schématique de la cartouche microfluidique,B- Vue schématique du système avec l 'intégration « plug and play » de la cartouche, C- Photographie du système portable dont la taille est de 16,5 x 11,5 x 7cm. [86]

Une autre technologie microfluidique par actionnement pneumatique a été développée par Parent et *al*. pour l'intégration d'un protocole d'immunodosage totalement automatisé. La cartouche microfluidique est composée d'une membrane hyper-élastique placée entre deux couches de COC (Figure I.11-A) [87]. Un actionnement pneumatique a pour fonction de déformer cette membrane, ce qui permet d'ouvrir et de fermer les micro-vannes pneumatiques intégrées et les chambres microfluidiques de la cartouche afin de contrôler les fluides (Figure I.11-B, C et D). Un protocole ELISA colorimétrique totalement automatisé a été mis au point en utilisant des billes magnétiques pour la détection de gluten dans des échantillons réels en moins d'une heure. Cette première preuve de concept a démontré la versatilité de la cartouche, capable de réaliser des mélanges, des calibrations, des dilutions et des lavages. La cartouche microfluidique peut réaliser 8 tests en parallèle : 4 zones pour réaliser une courbe d'étalonnage et 4 autres zones pour la détection de gluten, dans un dispositif microfluidique compact et automatisé (Figure I.11-E).

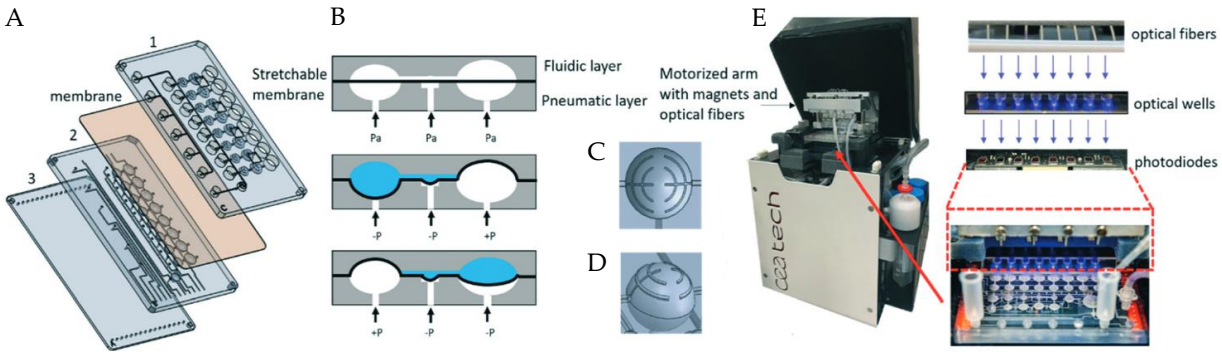


Figure I.11 : Plateforme automatisée développée par Parent et al. intégrant un dosage ELISA pour la détection de gluten, A- Vue éclatée de la cartouche microfluidique hybride avec le niveau fluidique (1), la membrane et les niveaux pneumatiques (2) et (3), B- Vue en coupe transversale des niveaux de la cartouche microfluidique avec une microvanne entre deux chambres sphériques, C- Vue de dessus d'une chambre, D- Vue en 3D d'une chambre, E- Plateforme microfluidique pour l'actionnement pneumatique et la détection optique [87].

Un résumé des différents systèmes intégrant un immunodosage en microfluidique présentés précédemment est présenté dans le Tableau I-3 :

Actionnement fluidique	**Matériaux du système microfluidique**	**Autonomie**	**Méthode de détection**	**Molécule détectée**	**LOD**	**Compatibilité OOC**	**Référence**
Pousse-seringue	Acrylique-Adhésif-Verre	Non	Fluorescence avec microbilles	CEA	0.1 ng/mL	Oui	[80]
Pousse-seringue	PDMS	Non	Chimi-luminescence	Testos-térone	0.02 ng/mL	Oui	[81]

Capillarité	PDMS et PMMA	Oui	Fluorescence indirecte et ELISA avec microbilles	Anticorps infliximab	3 µg/mL	Non	[82]
Electro-magnétique	PDMS	Oui	Chimi-luminescence avec billes magnétiques	Interleukine 6 (IL-6) et Protéine C-réactive (CRP)	10 pg/moL (IL-6), 100 pg/moL (CRP)	Oui	[85]
Centrifuge	Polychlorure de vinyle (PVC)	Oui	ELISA	Antigène de la prostate (PSA)	0,07 ng/mL	Non	[84]
Electro-pneumatique	Acrylique	Oui	Fluorescence en sandwich	SRAS-CoV-2	31,1 ng/mL	Oui	[86]
Pneumatique	COC	Oui	ELISA sur billes magnétiques	Gluten (Gliadine)	2ppm (<8ng/mL)	Oui	[87]

Tableau I-3 : Résumé des systèmes microfluidiques intégrant un immunodosage.

Dans l'état de l'art actuel des dispositifs microfluidiques appliqués à l'intégration de protocoles d'immunodosage, il semble que peu de systèmes proposent une solution véritablement intégrée et automatisée. Parmi ceux qui existent, la plupart ne permettent la réalisation que d'un nombre limité de tests simultanés et multiplexés, tout en restant volumineux et donc complexes à intégrer dans des organoïdes-sur-puce. Bien que les immunodosages offrent une grande sensibilité et permettent l'analyse simultanée de plusieurs cibles, ils reposent sur l'utilisation de marqueurs et exigent souvent des étapes de préparation d'échantillons complexes, ce qui allonge le temps d'analyse et en accroît le coût.

Les organes-sur-puce et les organoïdes-sur-puce sont des modèles nécessitant des technologies de biodétection adaptées, capables de détecter avec précision les signaux biologiques dans ces modèles *in vitro* [88]. Dans ce contexte, le développement des biocapteurs est une alternative prometteuse pour répondre à ces limitations.

I.4 Biocapteurs : principe et intégration microfluidique

Cette partie introduit le principe de fonctionnement des biocapteurs, en se concentrant plus particulièrement sur les biocapteurs optiques, avec et sans marquage. Un état de l'art est ensuite consacré à leur intégration en microfluidique, mettant en évidence les limitations actuelles, notamment pour l'étude des sécrétions d'organoïdes.

I.4.1 Les biocapteurs pour l'analyse d'échantillons biologiques

i. Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques capables de convertir une réponse biologique en un signal mesurable [89]. Ce processus repose sur l'utilisation de biorécepteurs, des entités biologiques telles que des anticorps, des aptamères, ou encore des enzymes, qui assurent la reconnaissance spécifique de la cible d'intérêt, appelée analyte. Ces éléments de reconnaissance sont immobilisés à la surface d'un matériau jouant le rôle de capteur. Cette immobilisation est possible grâce à différentes techniques de fonctionnalisation chimique de surface. Une fois la biomolécule capturée par le biorécepteur, la méthode de transduction du capteur convertit cette interaction biologique en un signal mesurable et exploitable. La Figure I.12 représente les différents blocs qui composent un biocapteur. Le terme « biocapteur » est apparu dans les années 1960 avec les travaux de Leland C. Clark portant sur la création d'un dispositif conçu pour mesurer le niveau de glucose en utilisant comme sonde la glucose oxydase sur une électrode à oxygène [90]. Depuis, de nombreux biocapteurs ont vu le jour utilisant différentes méthodes de transduction : électrochimique [91], optique [92], mécanique [93], thermique [94] ou acoustique [95]. Chacune a ses avantages et limitations selon l'application souhaitée et l'analyte à détecter.

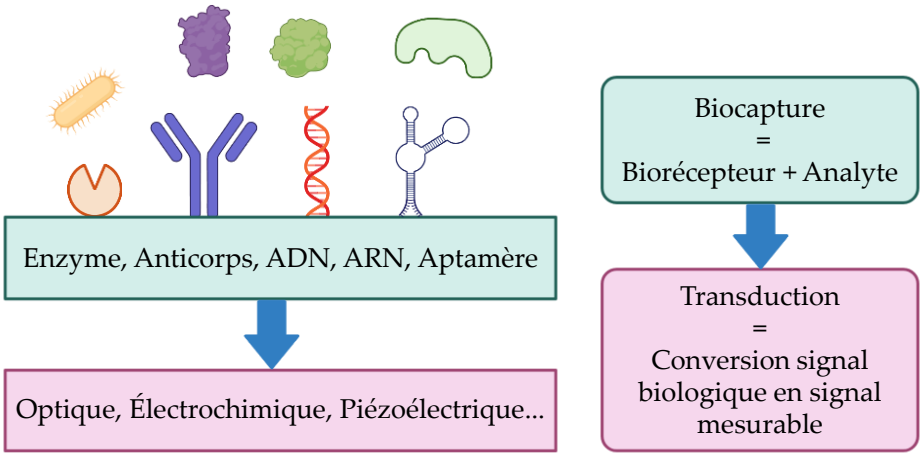


Figure I.12 : Principaux composants d'un biocapteur. Les biocapteurs capturent leur cible biologique via des biorécepteurs immobilisés à leur surface (à partir de chimie de surface) et convertissent ce signal en un signal mesurable via un transducteur (physique ou chimique). Le transducteur transmet ensuite ce signal à un système électronique de lecture et de traitement du signal adapté à la méthode de transduction.

Grâce à leurs mesures sélectives, rapides, parfois en temps réel de cibles biologiques ou biochimiques, les biocapteurs sont devenus des outils indispensables dans de nombreux domaines tels que l'industrie agroalimentaire, l'environnement et la santé pour de multiples applications (sécurité alimentaire, détection de polluants, diagnostic de maladies). Les biocapteurs peuvent s'intégrer dans des dispositifs compacts grâce à leur miniaturisation. En réduisant la taille des composants, il est possible de regrouper de nombreux biocapteurs sur une petite surface de quelques cm^2 formant un réseau de détection dans un seul dispositif sur des substrats tels que le verre, le silicium ou les plastiques souples. Ces systèmes miniaturisés sont appelés des biopuces. À l'instar des biocapteurs unitaires, les biopuces peuvent utiliser divers éléments biologiques comme biorécepteurs et donc permettre le multiplexage de l'analyse.

Dans notre cas, nous nous intéressons plus particulièrement aux biocapteurs basés sur une transduction optique. Il existe deux familles de transduction optique : la détection *via* un marqueur et la détection sans marquage.

i. Transducteur optique avec marquage

La transduction avec marquage repose sur l'emploi de marqueurs optiques généralement fluorescents, colorimétriques ou chimiluminescents. Dans ce type de système, le biocapteur est fonctionnalisé avec un biorécepteur et une variation de signal optique est détectable si la cible est capturée par sa sonde biologique. En général, ce signal est émis par un marqueur soit directement lié à la cible, soit lié à un réactif secondaire (comme un anticorps secondaire). Ce type de technique peut être associé aux immunodosages hétérogènes car les biorécepteurs sont directement fixés sur une surface, contrairement aux immunodosages homogènes réalisés en solution.

La fluorescence est l'un des marquages les plus répandus. Cette méthode présente l'avantage d'une grande sensibilité et d'une compatibilité avec l'analyse de plusieurs cibles en parallèle. Plusieurs approches exploitent la fluorescence pour générer un signal optique, telles que les puces à ADN (microarrays), les immunodosages hétérogènes avec des fluorophores ou des quantum dots, ou les systèmes basés sur des interactions par FRET (Förster Resonant Energy Transfer) permettant de suivre des interactions moléculaires en temps réel et multiplexé [96]. Bien que très performante, cette méthode a pour inconvénient de pouvoir être affectée par des phénomènes tels que le photoblanchiment et nécessite des étapes supplémentaires de marquage plus coûteuses. C'est également une méthode généralement semi-quantitative.

Même si la transduction optique via des marqueurs reste une technologie de référence dans le domaine du diagnostic biologique et de la recherche biomédicale, les biocapteurs optiques sans marquage offrent la possibilité de réaliser des analyses quantitatives en continu et en temps réel, en réduisant les étapes du protocole et sans modifier la cible d'intérêt.

ii. Transducteur optique sans marquage

Les méthodes de transduction optique sans marquage reposent le plus souvent sur la détection d'une variation d'indice de réfraction local induite par la fixation de l'analyte à la

surface du capteur. Cette variation d'indice modifie les conditions de propagation ou de résonance de la lumière, ce qui se traduit par une variation mesurable du signal optique (décalage spectral, variation d'intensité, déphasage…). Pour mettre en évidence la biodétection, la réponse du capteur optique est en général mesurée au cours de plusieurs étapes, dont une phase initiale correspondant au niveau de référence sans analyte (Figure I.13.1), suivie d'une phase d'association lors de la mise en contact avec l'analyte, caractérisée par une augmentation progressive du signal jusqu'à atteindre un plateau d'équilibre (Figure I.13.2 et Figure I.13.3). Une étape finale de rinçage est nécessaire et entraîne une diminution partielle du signal avant stabilisation, correspondant à la dissociation des analytes non accrochés spécifiquement (Figure I.13.3). Le signal de biodétection est donc déterminé par une mesure différentielle, définie comme la différence entre le signal final à l'équilibre et le signal de référence (Figure I.13.4). Dans la suite de cette section, trois grandes familles de capteurs parmi les plus utilisés sont présentées : les dispositifs à résonance plasmonique et les dispositifs photoniques incluant les interféromètres et les résonateurs diélectriques.

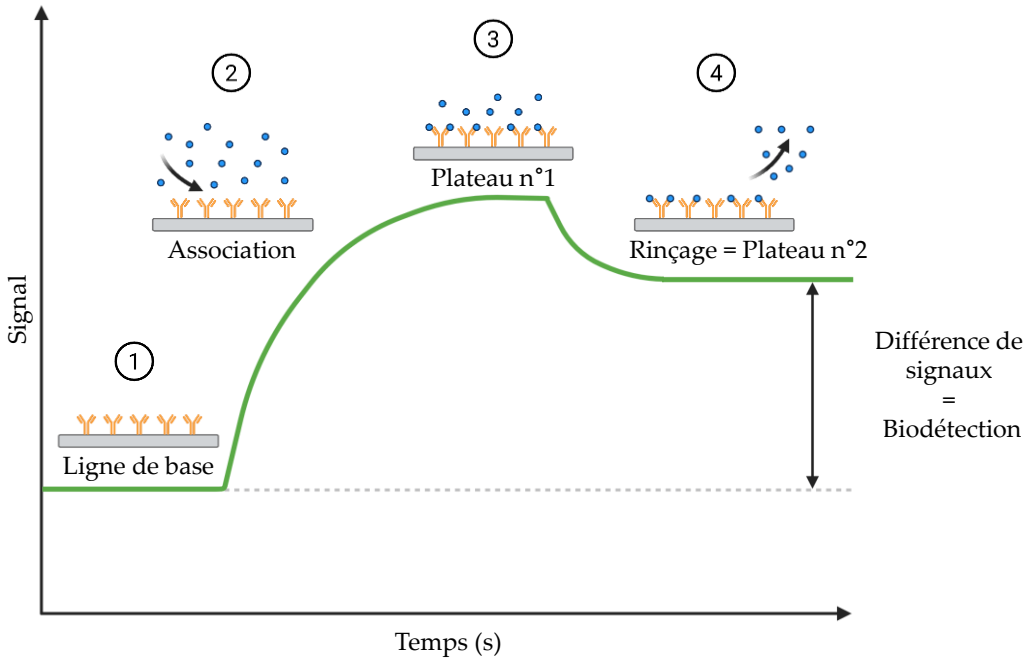


Figure I.13 : Variation schématisée du signal d'un capteur optique lors d'une mesure de biodétection, composée de 4 étapes, (1) le signal de référence ou ligne de base (sans analyte), (2) étape d'association des biomolécules avec les biorécepteurs à la surface du capteur, (3) plateau de stabilisation, (4) étape de rinçage pour obtenir le signal final à comparer au signal de la ligne de base. Adapté à partir d'une figure sur BioRender.com.

- **Dispositifs à résonance plasmonique de surface (SPR)**

La résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance, SPR) est un phénomène physique d'interaction entre la lumière et la matière. Elle repose sur l'excitation d'ondes électromagnétiques appelées plasmons de surface, qui apparaissent à l'interface entre un métal (souvent l'or) et un diélectrique (comme l'eau) et sont très sensibles aux variations des indices de réfraction à proximité de la surface métallique. Lorsque des biorécepteurs sont fixés sur cette interface métal/diélectrique et que ceux-ci capturent des biomolécules, l'indice de réfraction local est modifié et entraîne un décalage spectral de la résonance plasmon. Dans

la configuration de mesure la plus standard, illustrée sur la Figure I.14, le plasmon est excité à travers un prime et cette excitation se traduit sous la forme d'une raie noire dans le faisceau réfléchi. Le décalage de la résonance en présence des biomolécules cibles entraine une variation de l'angle de réflexion et un déplacement de la raie noire. Ce déplacement est mesuré optiquement et permet de détecter et quantifier les biomolécules capturées à la surface du capteur [97], [98]. La SPR se caractérise par une sensibilité élevée, pouvant atteindre quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers de nanomètres par unité de variation d'indice de réfraction (nm/RIU) [99]. Le multiplexage peut cependant être difficile à mettre en place avec un tel système. C'est pourquoi d'autres techniques ont été développées, notamment la microscopie à résonance plasmonique de surface (SPR imaging, SPRi) [100]. Cette technique est particulièrement adaptée pour le criblage des interactions entre les protéines et leurs ligands et est déjà commercialisée (OpenPleX, Horiba), mais les dispositifs restent volumineux. La recherche en nanoplasmonique a permis de débloquer ce verrou avec le développement de la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR, Localized SPR) qui s'affranchit de l'excitation par prisme. [101]. Grâce à ce type de capteur, plus compact et plus facile à intégrer, des dispositifs commerciaux portables ont été développés (Nicoya OpenSPR, Nicoya Lifesciences).

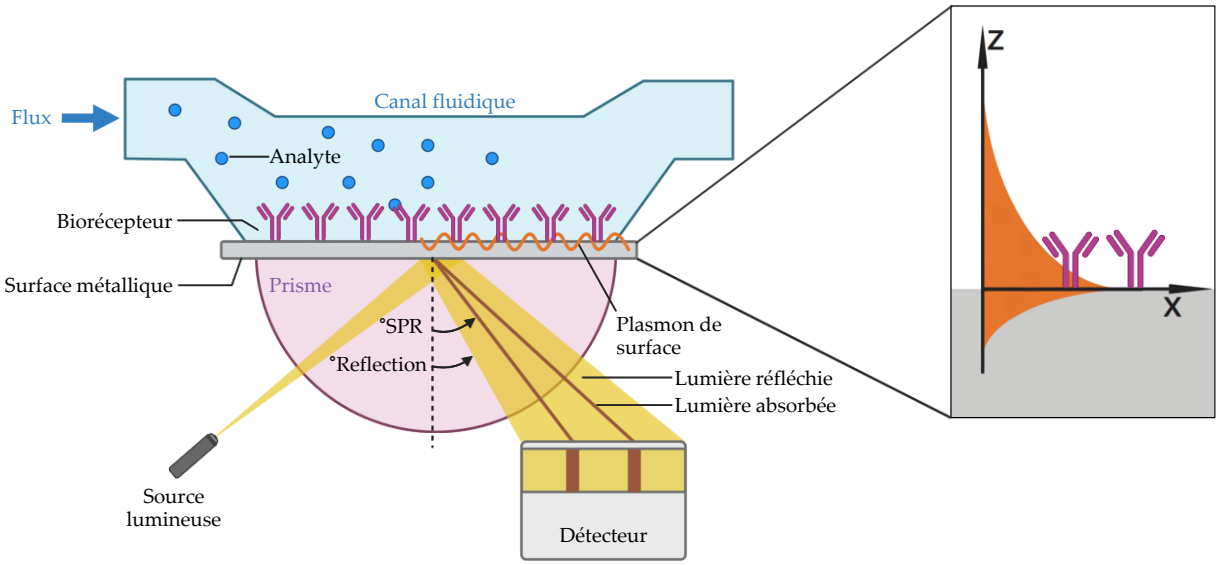


Figure I.14 : Principe de détection du capteur SPR avec à droite en encadré la distribution schématique du profil d'intensité du mode optique très sensible à proximité de la surface métallique. Adapté à partir d'une figure sur BioRender.com.

- **Dispositifs photoniques**

Dans les dispositifs photoniques, le champ électromagnétique est confiné dans un matériau diélectrique (souvent du silicium, un nitrure ou un oxyde, mais aussi parfois l'eau). Seule sa partie évanescente franchit l'interface entre le matériau diélectrique et l'environnement extérieur (Figure I.15.A) et est sensible aux variations de l'indice de réfraction au voisinage de cette interface. Le dispositif exploite cette sensibilité du mode optique aux variations d'indice près de la surface pour détecter les biomolécules capturées par les biorécepteurs greffés sur le capteur. Contrairement aux modes plasmoniques, l'intensité du

champ au niveau de la surface est plus faible dans ces structures diélectriques, ce qui se traduit par une sensibilité plus faible. En revanche les matériaux diélectriques, dont sont faits ces dispositifs, présentent des pertes optiques beaucoup plus faibles que les métaux. Ces faibles pertes permettent de mettre en œuvre différents mécanismes d'interférences (interféromètres de Mach-Zehnder ou Michelson par exemple) ou de résonance (anneaux, disques, ou encore résonances de cristaux photoniques) avec des variations de signal abruptes qui compensent la sensibilité plus faible et permettent d'atteindre des performances compétitives avec les techniques plasmoniques. Dans les interféromètres, une variation d'indice du mode optique a pour effet un décalage des franges d'interférence observées entre un bras de mesure et un bras de référence (Figure I.15.B) [102]. Dans le cas particulier des cristaux photoniques, le contrôle de la propagation de la lumière offert par leur structure périodique (Figure I.15.C) permet de concentrer et d'amplifier le champ optique dans des cavités ou des modes à propagation très lente afin d'amplifier l'interaction lumière-matière. Certains de ces dispositifs peuvent être excités directement à incidence normale comme pour les dispositifs LSPR évoqués ci-dessus, ce qui leur confère un grand avantage en termes d'intégration et de compacité. Les capteurs à cristaux photoniques ont en général une sensibilité similaire aux autres résonateurs, pouvant aller au-delà du millier de nm/RIU dans le cas d'ingénieries complexes [103].

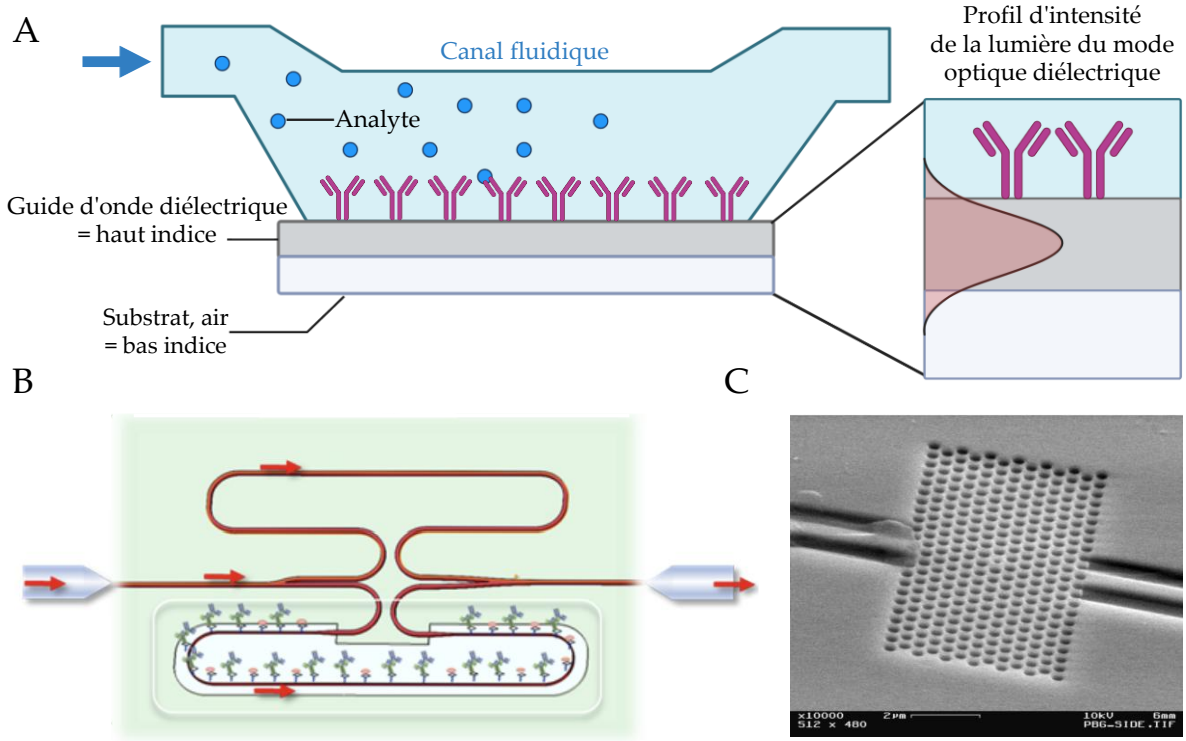


Figure I.15 : Principe de fonctionnement et exemples de capteurs diélectriques (A) : Interface d'un capteur diélectrique avec dans l'encadré le profil d'intensité de la lumière du mode optique diélectrique, (B) exemple d'interféromètre Mach-Zhender [104], (C) exemple d'un capteur à cristaux photoniques [105].

Les capteurs optiques diélectriques offrent de nombreux avantages : sensibilité, détection sans marquage et multiplexée avec un temps de réponse rapide, parfois même en temps réel. De plus, l'utilisation de matériaux CMOS-compatibles comme le silicium et le nitrure de silicium rend possible leur production à grande échelle et à moindre coût [106]. Aujourd'hui, des dispositifs intégrant des anneaux résonants sont disponibles sur le marché,

tels que l'instrument inQuiQ de chez Delta Life Science, à destination des chercheurs, ou le dispositif Merlin de chez Genalyte pour un usage médical [107].

iii. Fonctionnalisation chimique et biologique de surface du capteur

La fonctionnalisation de la surface est une étape essentielle dans la conception d'un biocapteur, car elle permet d'immobiliser les biorécepteurs sur sa surface. Généralement, elle est composée d'une première étape de fonctionnalisation chimique qui permet d'introduire des groupements réactifs à la surface du capteur, suivie d'une étape de fonctionnalisation biologique qui permet l'immobilisation des biorécepteurs via les groupements réactifs. Plusieurs méthodes de fonctionnalisation existent, adaptées à la nature du capteur et du biorécepteur :

- L'immobilisation par adsorption physique qui consiste à immobiliser les biomolécules par des interactions non covalentes, telles que des forces de Van der Waals, des interactions électrostatiques (Figure I.16.A). Cette méthode est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas de modification chimique préalable de la surface. Cependant, elle présente une stabilité limitée face aux variations de pH ou de température, aux solutions à haute force ionique ou aux détergents. De plus, il est impossible de prévoir l'orientation des biorécepteurs à la surface du biocapteur, ce qui peut réduire l'accessibilité de leur site actif et, par conséquent, l'efficacité et la sensibilité du biocapteur [108].

- L'immobilisation au sein de matrices polymériques ou d'hydrogels (Figure I.16.D), qui consiste à piéger les biorécepteurs dans un réseau polymérique tridimensionnel, déposé à la surface du capteur. Cette approche favorise le maintien de l'activité biologique et augmente la densité de sites réactifs, mais n'est pas une méthode orientée [109].

- L'immobilisation à l'aide de biomolécules intermédiaires qui repose sur des interactions spécifiques, par exemple le système biotine-streptavidine ou les protéines A/G pour l'immobilisation orientée d'anticorps (Figure I.16.C). Cette stratégie permet un meilleur contrôle de l'orientation des biorécepteurs [110].

- L'immobilisation covalente qui crée des liaisons chimiques entre le biorécepteur et la surface préalablement fonctionnalisée chimiquement, généralement avec des groupements réactifs tels que les amines (-NH_2), carboxyles (-COOH) ou thiols (-SH). Des couches intermédiaires sont utilisées comme bras espaceurs, tels que les monocouches auto-assemblées (SAMs), les silanes ou les polymères (Figure I.16.B). Cette approche assure une meilleure stabilité dans le temps que l'immobilisation par absorption ou avec des biomolécules intermédiaires [108]. L'orientation des biorécepteurs dépend du mécanisme réactionnel mis en jeu, par exemple via la chimie click, une réaction covalente rapide et spécifique qui permet l'immobilisation orientée des biorécepteurs [111].

Le choix de la méthode d'immobilisation dépend de critères tels que la stabilité chimique, l'orientation et l'accessibilité du biorécepteur, ainsi que la compatibilité avec le type de transduction utilisé.

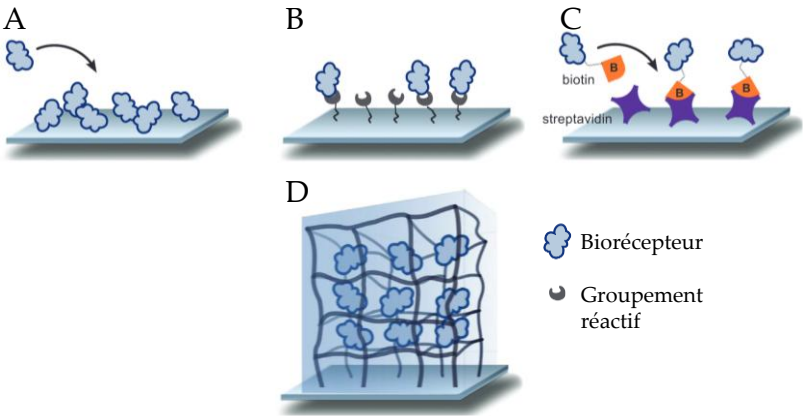


Figure I.16 : Méthodes de fonctionnalisation de surface, A- immobilisation par adsorption physique, B- immobilisation covalente, C- immobilisation à l'aide de biomolécules intermédiaires, D- immobilisation au sein de matrices polymériques ou d'hydrogels [109].

Les capteurs optiques ont montré leurs bonnes performances en termes de sensibilité et de possibilité de multiplexage et offrent de nombreuses possibilités dans le domaine de la biodétection [112]. Le couplage de biocapteur optique avec les organoïdes-sur-puces permettrait une étude de ces modèles, non invasive, au plus près des cultures, avec un suivi dans le temps des modèles [113]. Cependant ce type d'approche nécessite un contrôle précis des flux pour obtenir un signal différentiel mesurable et assurer la reproductibilité des résultats, ce qui justifie leur intégration dans des systèmes microfluidiques pour une analyse automatisée et optimisée. Leur intégration au sein d'une plateforme microfluidique pourrait s'imposer comme un outil analytique complémentaire, offrant de nouvelles perspectives pour l'étude des organoïdes-sur-puce [88], [114], [115] (Figure I.17). Ce type de plateforme intégrée permettrait d'améliorer la reproductibilité des cultures d'organoïdes grâce à l'automatisation et au suivi des biocapteurs, mais aussi de réaliser des études plus poussées sur la modélisation de maladies et le criblage de médicaments. [21], [115], [116], [117], [118].

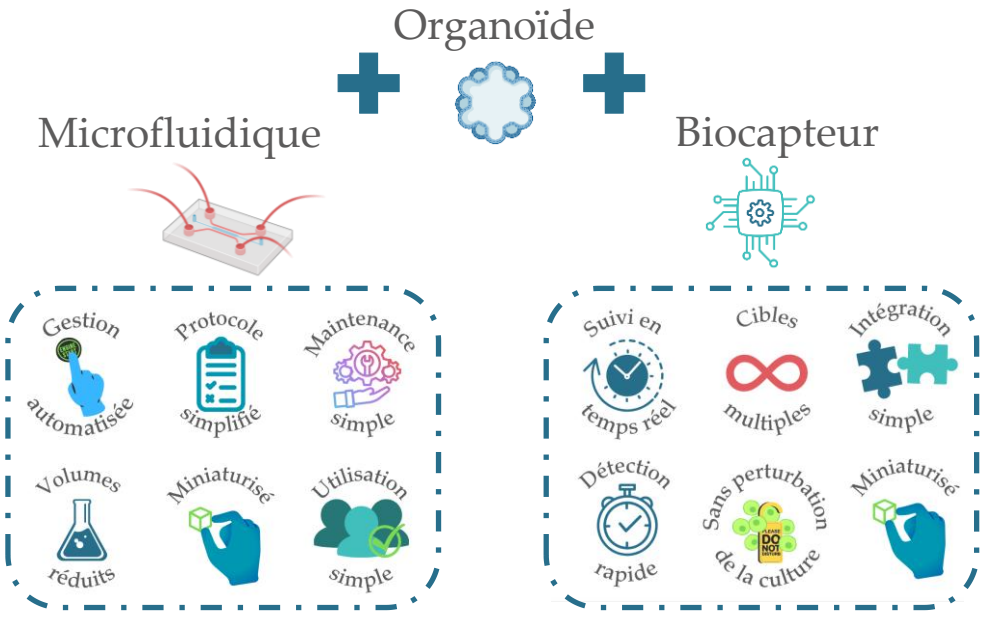


Figure I.17 : Présentation schématique des avantages de la microfluidique et des biocapteurs pour la réalisation d'une plateforme de culture et d'analyse d'organoïde optimale.

I.4.2 Intégration et automatisation des biocapteurs en microfluidique

La convergence des biocapteurs avec la microfluidique vise à combiner, d'un côté, la précision analytique des biocapteurs, de l'autre, la précision de contrôle des fluides avec la microfluidique. Cela permettrait de développer des dispositifs miniaturisés, à faible consommation de réactifs et avec une grande rapidité d'analyse d'échantillons complexes grâce à des protocoles automatisés [106]. Cette partie présente un état de l'art des différentes stratégies d'intégration de biocapteurs en microfluidique de manière générale, puis adaptées à l'étude des organoïdes-sur-puce.

i. Système de contrôle fluidique pour les biocapteurs

Pour être exploitables, les biocapteurs doivent être mis en contact avec l'échantillon à analyser, ce qui nécessite un système de contrôle fluidique adapté. Dans les premières phases de développement d'un biocapteur, cette gestion fluidique reste souvent très sommaire avec des systèmes contrôlés par des instruments externes pour assurer l'injection des fluides dans une seule zone de détection [119]. Cependant, lorsque l'on souhaite réaliser plusieurs analyses en parallèle, pour effectuer des réplicats expérimentaux ou des tests sous différentes conditions, l'acheminement des fluides vers plusieurs zones de détection complexifie l'architecture fluidique.

Prenons l'exemple du système développé par Nonglaton et *al.* au CEA Leti, qui intègre une biopuce composée d'interféromètres Mach-Zehnder. Le système fluidique a été développé pour l'injection d'échantillons dans 8 canaux de détection différents [120]. Le système est composé de nombreuses tubulures et de raccords fluidiques pour assurer l'alimentation des canaux (Figure I.18).

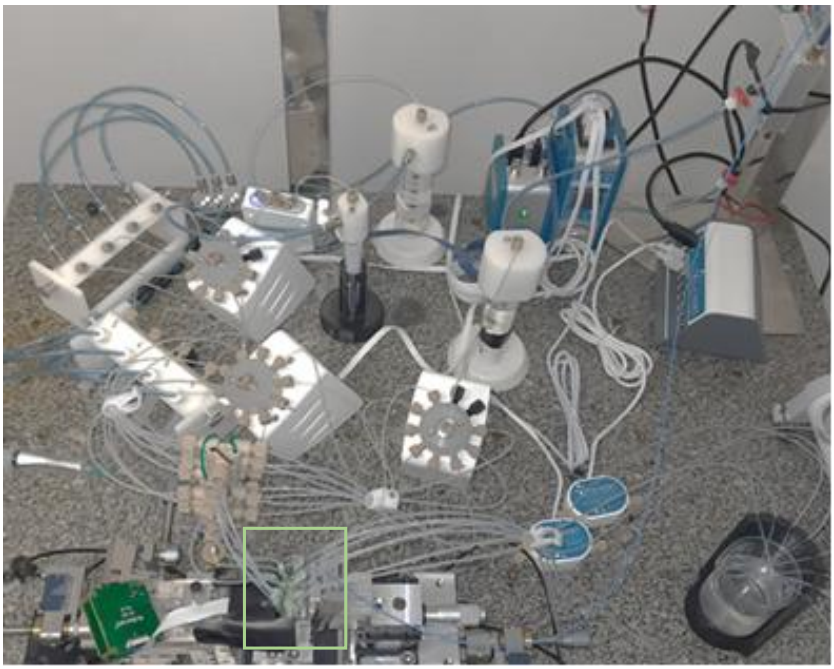


Figure I.18 : Système fluidique développé par Nonglaton et al. pour l'injection d'échantillons dans les 8 zones de détection d'un biocapteur MZI situé dans le rectangle vert. Des contrôleurs en pression sont utilisés pour injecter les tampons et les réactifs [120].

Cependant, bien que cette configuration permette la validation expérimentale du système de détection, elle met en évidence plusieurs limitations lorsque le nombre de voies augmente. L'utilisation de longues tubulures génère des volumes morts qui entraînent la perte d'échantillons et nécessite des volumes initiaux élevés. Le nombre important de connexions fluidiques augmente le risque de fuite et de formation de bulles d'air, susceptibles d'altérer la stabilité des mesures. De plus, le passage successif de plusieurs échantillons dans les mêmes tubulures favorise les contaminations croisées, ce qui impose des étapes de rinçage prolongées. Cette complexité fluidique encombre le système et demande une maintenance importante même si l'actionnement fluidique est automatisé. Ces contraintes illustrent les limites d'une fluidique non intégrée, en particulier lorsque plusieurs canaux de détection sont présents dans le système.

Pour dépasser ces verrous, la microfluidique intégrée offre des solutions adaptées pour le développement de plateformes de détection incluant des biocapteurs. En travaillant sur de très petits volumes, elle permet non seulement de réduire les volumes morts et donc les pertes d'échantillons, mais aussi d'accélérer les cinétiques de réaction, se traduisant par des temps de réponse plus courts [106]. De plus, la microfluidique assure un acheminement contrôlé et reproductible des fluides au sein du système, ce qui peut améliorer les limites de détection des capteurs [121]. Cette administration précise des échantillons vers les biocapteurs est une étape clé pour fiabiliser les mesures et améliorer la reproductibilité ainsi que les performances des dispositifs, mais reste un défi majeur dans l'intégration de biocapteurs en microfluidique [122], [123]. Afin de mieux comprendre les stratégies actuellement mises en œuvre et les enjeux rencontrés pour le développement de plateformes microfluidiques intégrant des biocapteurs, il est pertinent de s'intéresser à l'état de l'art des différentes méthodes d'intégration de biocapteurs.

ii. Méthodes et critères d'intégration des biocapteurs en laboratoires-sur-puce

Dans la littérature, l'intégration de capteurs et de biocapteurs dans des systèmes microfluidiques reste encore un défi technologique majeur. La diversité des combinaisons possibles entre types de capteurs et matériaux microfluidiques n'a pas permis l'émergence d'une méthode d'intégration standardisée. Les stratégies d'intégration sont généralement adaptées aux contraintes spécifiques de la technologie de détection et de l'application visée. La majorité des systèmes reposent sur une approche modulaire, dans laquelle le capteur et le système microfluidique sont fabriqués séparément puis assemblés pour former un système complet [124]. Il existe plusieurs méthodes d'intégration, mais trois d'entre elles sont couramment utilisées :

- L'assemblage par adhésif qui repose sur l'utilisation de films double face, permettant le collage du capteur sur le système microfluidique. Cette méthode présente l'avantage d'être simple et compatible avec de nombreux matériaux. Cependant, les compatibilités biologique et chimique de l'adhésif doivent être vérifiées. L'intégration est généralement permanente, ce qui peut limiter la réutilisation du système ou du capteur. Un alignement précis entre les zones de détection et les canaux est indispensable.

- Le scellement par plasma d'oxygène (plasma O_2) ou par UV/ozone est largement utilisé pour le collage entre PDMS/verre ou PDMS/silicium. Cette technique permet un scellement robuste et une excellente étanchéité. Elle nécessite également un alignement précis. L'intégration du capteur est très souvent permanente.

- L'assemblage mécanique, par clampage ou compression, à l'aide de joints. Cette approche constitue une alternative réversible qui permet la réutilisation du système fluidique ou du capteur. Elle peut cependant augmenter l'encombrement du dispositif et générer des contraintes mécaniques au système.

Plusieurs critères doivent être considérés pour assurer une bonne intégration lors du choix de la méthode d'assemblage. Les dispositifs doivent garantir une étanchéité robuste, être compatibles avec les méthodes de détection, tout en évitant de détériorer la fonctionnalisation de surface et les performances générales du capteur [124]. Le système microfluidique doit permettre une gestion contrôlée et idéalement automatisée de plusieurs fluides afin d'améliorer la reproductibilité des mesures et doit être compact.

iii. Laboratoires-sur-puce intégrant des biocapteurs optiques

Dans de nombreux cas, les biocapteurs optiques sont intégrés dans des systèmes microfluidiques en PDMS, principalement par scellement au plasma O_2. Cette approche permet un prototypage rapide et une intégration robuste et simple du capteur, adaptée aux preuves de concept, en se concentrant sur l'amélioration de la méthode de transduction et l'application biologique, [104], [125], [126], [127].

Wang et *al*. ont ainsi développé un système optofluidique basé sur des capteurs à interféromètre Mach-Zehnder (MZI). Le dispositif est composé de plusieurs niveaux : le capteur optique, une couche de protection et le niveau fluidique en PDMS (Figure I.19-A). Les éléments sont traités au plasma O_2 pendant 30 s puis assemblés par compression à 70 °C pendant 3 h. Cette méthode d'intégration coche de nombreux critères, mais ses nombreuses étapes complexifient l'assemblage et augmentent le temps de fabrication. Par ailleurs, le système ne permet qu'une seule analyse et repose sur un pousse-seringue externe pour la gestion fluidique. Cela est adapté pour cette configuration, mais devient limitant lorsque l'on vise la parallélisation de plusieurs tests.

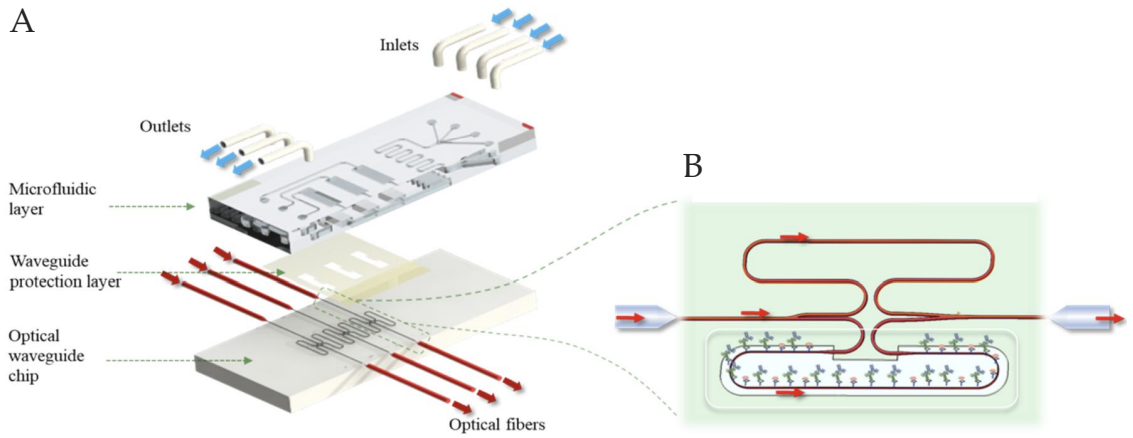


Figure I.19: Système microfluidique en PDMS développé par Wang et al. qui intègre un biocapteur MZI, A -Vue éclatée de l'intégration, composée de trois niveaux : le capteur optique, une couche de protection et le niveau fluidique en PDMS, assemblés par plasma O_2 ,B- Grossissement sur les guides d'ondes du capteur dont une partie est fonctionnalisée avec des biorécepteurs [104].

Tokel et al. ont développé une plateforme plus compacte combinant un module optique portable et une cartouche microfluidique en PMMA intégrant un biocapteur [128]. La cartouche est composée de deux plaques de PMMA assemblées à l'aide de film adhésif et d'une seconde couche d'adhésif permettant de former le microcanal fluidique et d'intégrer le biocapteur à la cartouche. L'assemblage PMMA/adhésif/PMMA/adhésif/capteur se visse directement dans le boîtier noir du système de détection (Figure I.20). L'intégration est simple et rapide, et le module optique est miniaturisé. Cependant le dispositif permet une seule détection et repose sur un pousse-seringue pour la gestion fluidique.

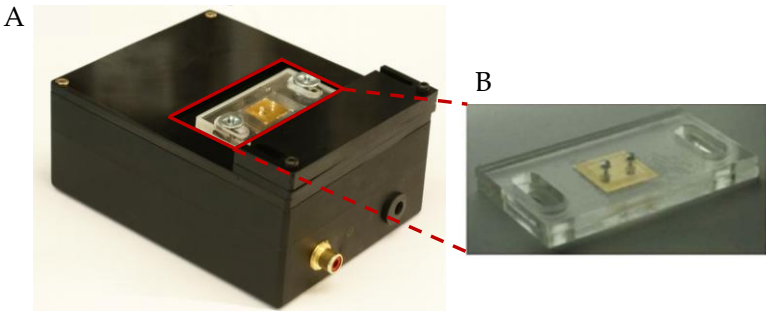


Figure I.20 : Tokel et al. ont développé une plateforme optofluidique compacte combinant un système microfluidique jetable intégrant un capteur SPR à un module de détection optique compact, A- Plateforme complète intégrant le système microfluidique dans le module optique (boîtier noir) avec des vis, B- Système microfluidique intégrant le biocapteur SPR avec un assemblage par adhésif [128].

Les exemples précédents montrent que des intégrations simples et fonctionnelles sont possibles mais ne permettent principalement que des analyses uniques en utilisant qu'un seul canal de détection. L'utilisation de biocapteurs optiques implique des protocoles fluidiques plus complexes, avec plusieurs fluides manipulés séquentiellement. Le passage à des tests multiples n'est pas compatible avec des systèmes de gestion fluidiques, comme présenté précédemment avec le système de Nonglaton et *al.* Or, c'est dans ces conditions que la microfluidique intégrée offre un réel atout, mais peu de dispositifs proposent une microfluidique compacte et automatisée.

Szydzik et *al.* ont ainsi développé une plateforme optofluidique combinant un biocapteur interférométrique et un système microfluidique entièrement automatisé, intégrant des micro-vannes et une pompe à diaphragme (Figure I.21-A) [129]. Le système est composé de plusieurs niveaux : un premier niveau en PDMS pour les réservoirs d'entrée/sortie, un second niveau en PDMS, moulé par injection, intégrant les canaux fluidiques, les micro-vannes et le réseau pneumatique, et finalement le dernier niveau, correspondant au biocapteur. Un capot en COC permet un clampage mécanique de l'assemblage sur un support, à l'aide de vis (Figure I.21- B). Cet assemblage est simple et permet la réutilisation du système microfluidique et du biocapteur. Le dispositif a été validé avec un immunodosage compétitif suivi d'une régénération du biocapteur, démontrant la capacité du système à gérer des protocoles complexes pour la détection de molécules de manière automatisée, sans marquage et compatible avec une analyse sur le long terme. Bien que la microfluidique soit intégrée, une seule analyse est possible actuellement, mais la plateforme est très prometteuse pour la parallélisation de tests et le multiplexage.

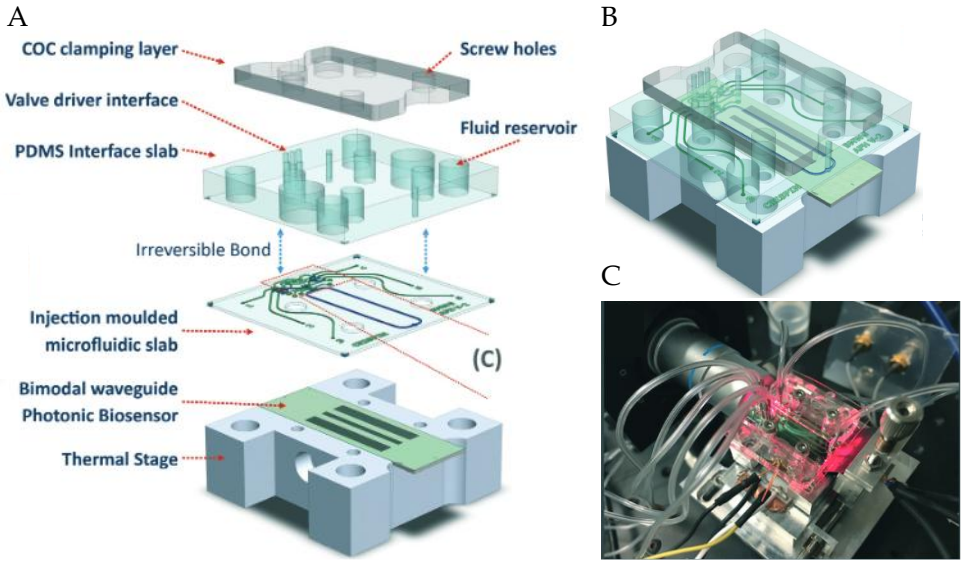


Figure I.21 : Plateforme optofluidique développée par Szydzik et al. combinant un biocapteur interférométrique et un système microfluidique automatisé A- Vue éclatée du système, B- Modèle CAO du module microfluidique réutilisable relié de manière réversible au capteur interférométrique à l'aide d'une structure de serrage, fixée au dispositif à l'aide de vis. C-Photographie du système complet [129].

L'un des principaux atouts de cette plateforme, en plus d'une véritable intégration microfluidique, est son intégration modulaire réversible, contrairement aux précédents systèmes. Dans le contexte du suivi de culture d'organoïdes, il est essentiel de pouvoir réaliser des analyses sur de longues périodes, allant de quelques jours à plusieurs semaines. La régénération de biocapteurs ou leur remplacement au cours de la culture est un critère supplémentaire pour une étude efficace. En effet, pour ces plateformes de suivi d'organoïdes, d'autres critères doivent être pris en compte pour obtenir une intégration optimale. La partie suivante se concentre donc sur ce sujet.

I.5 Biocapteurs pour l'analyse et le suivi des organoïdes-sur-puce

Cette section présente les critères supplémentaires qui doivent être pris en considération pour assurer une intégration performante de biocapteurs dans des organes-sur-puce. Dans un second temps, une revue de la littérature présente les avancées actuelles sur le développement de plateformes combinant culture d'organoïdes et biocapteurs.

I.5.1 Critères pour une plateforme de suivi d'organe-sur-puce

Le développement d'une plateforme dédiée au suivi d'organe-sur-puce repose sur l'optimisation conjointe de quatre composantes principales : la plateforme dans sa globalité, le biocapteur, la microfluidique et la méthode d'intégration du biocapteur.

La plateforme doit être compacte et totalement automatisée pour réaliser facilement des protocoles expérimentaux complexes et garantir la reproductibilité des résultats. La plateforme doit être compatible avec un incubateur pour permettre un maintien des conditions physiologiques (température, humidité). Enfin, elle doit être simple à utiliser avec une maintenance réduite pour limiter l'intervention d'un opérateur.

Le biocapteur doit permettre une détection quantitative, rapide et sans perturber les cultures. L'acquisition des données doit pouvoir être réalisée en temps réel ou à différents points de mesure rapprochés. Une sensibilité élevée est également requise pour détecter les faibles concentrations d'analytes sécrétés. Pour un suivi sur une longue période des cultures, le biocapteur doit pouvoir être régénéré ou remplacé grâce à une intégration réversible.

La méthode d'intégration doit également être simple d'utilisation et robuste. Elle doit être compatible avec la mesure ainsi qu'avec la fonctionnalisation de surface. Le biocapteur doit également être intégré au plus près de la culture pour éviter la dilution ou la perte des échantillons.

Le système microfluidique doit être intégré pour une gestion automatisée du réseau fluidique et permettre l'injection contrôlée de plusieurs réactifs (milieux, facteurs de stimulation, solutions de lavage, sécrétions) en limitant l'intervention humaine. La conception doit minimiser les volumes morts pour éviter la dilution des analytes sécrétés et minimiser l'apparition de bulles.

Pour aller plus loin, idéalement, le biocapteur devrait avoir une capacité de multiplexage pour analyser simultanément plusieurs biomarqueurs et le module microfluidique serait réutilisable pour réduire les coûts.

Tous les critères présentés précédemment sont compilés sur la Figure I.22 et vont être utilisés pour comparer les plateformes développées dans la littérature.

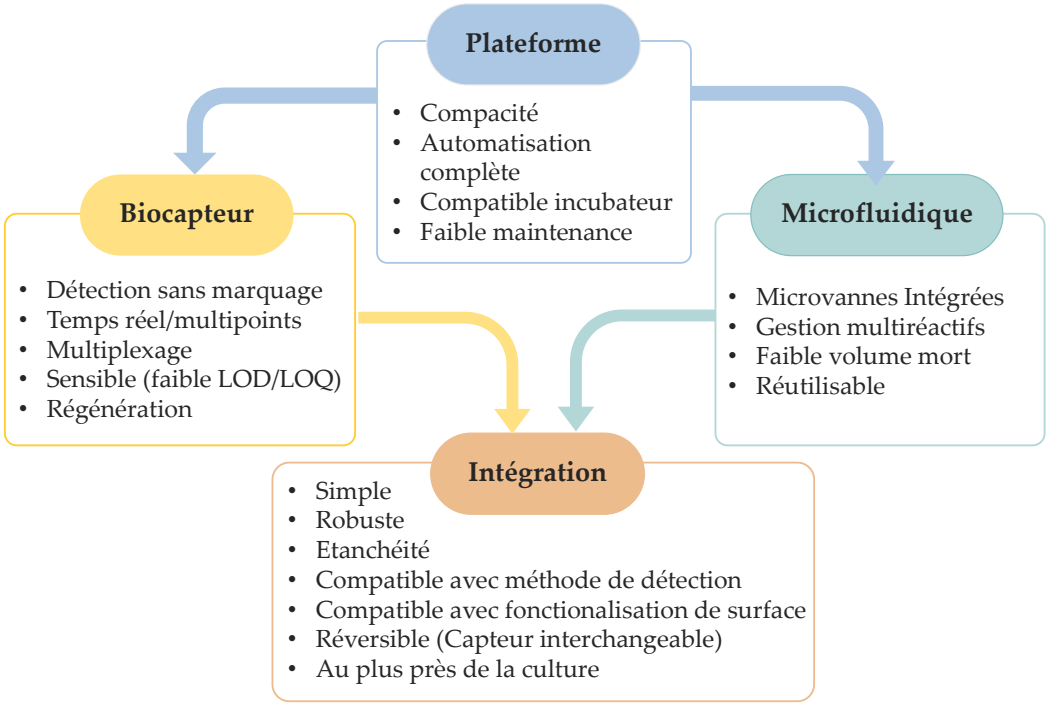


Figure I.22 : Critères pour le développement d'une plateforme intégrant culture et biodétection.

I.5.2 État de l'art des plateformes de culture et de suivi d'organoïdes et organes-sur-puce

La première partie de cet état de l'art présente deux plateformes développées pour différents modèles d'organoïdes ou d'organes-sur-puce puis la seconde se concentre sur une application précise : l'étude des modèles d'organoïdes de pancréas.

Shin et *al.* ont développé une plateforme dédiée à l'étude de la toxicité des médicaments sur un modèle d'organoïde hépatique en intégrant un biocapteur électrochimique pour détecter et quantifier en continu l'albumine, témoin du bon fonctionnement hépatique, et la glutathione S-transférase alpha (GST-α), un biomarqueur de lésion hépatique [130]. Par rapport aux critères liés au biocapteur, la plateforme répond aux exigences de détections multipoints et sans marquage. Le biocapteur a une sensibilité élevée, ce qui permet de détecter des concentrations plus faibles qu'un dosage ELISA pour l'albumine (0,023 ng/mL) et dans la plage physiologique pour la GST-α (0,01 ng/mL). Un protocole de régénération du biocapteur permet sa réutilisation jusqu'à 18 fois. Actuellement, une seule zone de détection est disponible, l'analyse simultanée des deux biomarqueurs n'est donc pas possible. Concernant la microfluidique, l'intégration de micro-vannes pneumatiques dans le système de détection permet l'injection séquentielle automatisée de plusieurs solutions pour la biodétection et la régénération du capteur (Figure I.23-A, B et C). En termes d'intégration, Shin et *al*. ont fait le choix d'utiliser deux systèmes distincts pour la culture et la biodétection (Figure I.23-B et E). Cette configuration implique l'utilisation de tubulures, susceptibles de générer des volumes morts et de complexifier la maintenance du système, notamment avec la gestion des nombreuses connectiques associées aux tubulures qui limitent également la robustesse de la plateforme. Le biocapteur est intégré par scellement au plasma O_2 mais sa capacité de régénération permet un suivi dans le temps des cultures.

Globalement, la plateforme est totalement automatisée et a permis un suivi des cultures jusqu'à 7 jours. Une pompe péristaltique est utilisée pour l'administration du milieu de culture, ce qui limite la miniaturisation de la plateforme (Figure I.23-D). Ainsi, la plateforme proposée par Shin et *al*. valide les critères d'automatisation, de performances et de régénération du biocapteur, mais ne permet actuellement pas une détection simultanée de biomarqueurs. De plus, même si le système permet une détection multipoints, la durée totale d'un cycle complet de fonctionnalisation (174 min), détection (58 min) et régénération (18 min) est d'environ 4 h incompressibles, ce qui limite la prise de données à une mesure par jour. Le manque de proximité entre la culture et le biocapteur influence directement la quantité de volume mort et le risque de dilution des échantillons à analyser.

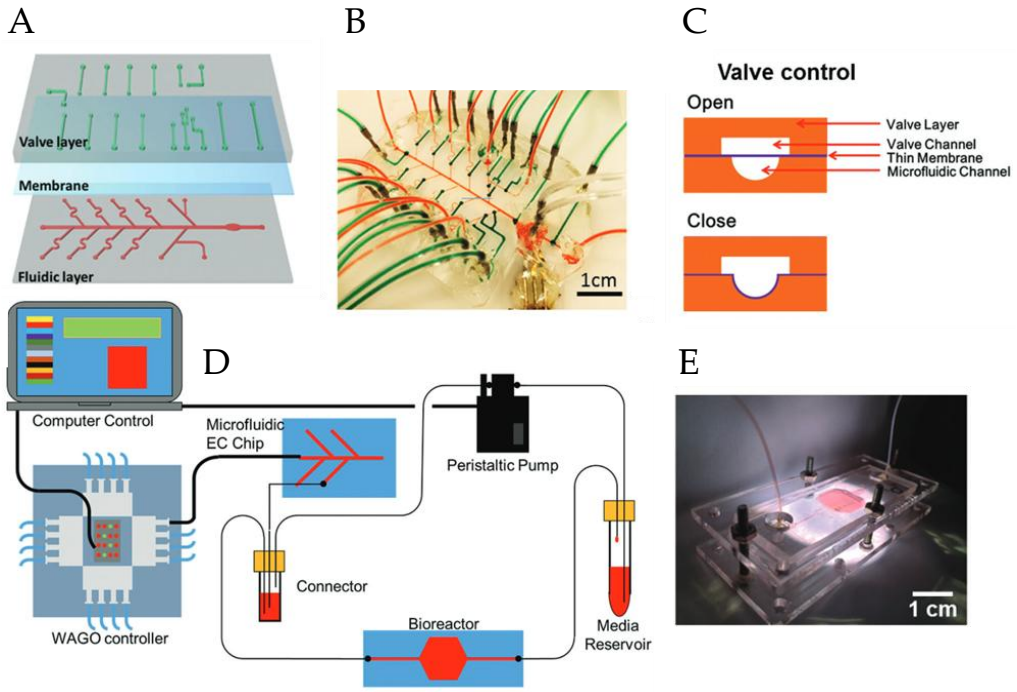


Figure I.23 : Plateforme développée par Shin et al. pour l'étude de la toxicité des médicaments sur un modèle d'organoïde hépatique A- Le système microfluidique en PDMS, composé d'un niveau fluidique, d'une membrane mince et d'un niveau pneumatique pour les vannes, B- Photographie du système microfluidique intégrant le biocapteur électrochimique, C- Principe de fonctionnement pour ouvrir et fermer le canal microfluidique via les vannes pneumatiques, D-Vue schématique du système complet, E- Photographie de l'organe-sur-puce [130].

Cognetti et *al.* ont développé une plateforme microfluidique couplant un biocapteur photonique à anneaux résonnants à un modèle d'épithélium bronchique pour réaliser une étude sur la réponse inflammatoire et la perméabilité pulmonaire (Figure I.24-A) [131]. Le biocapteur permet la détection en temps réel, sans marquage et multiplexée, de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6 et IL-8)) sécrétées par les cellules épithéliales et de protéine c réactive (c-reactive protein, CRP), injectée dans le système et utilisée comme traceur pour étudier la perméabilité de la membrane épithéliale. En termes d'intégration, la détection est réalisée directement sous la culture, évitant la perte d'analyte. Cependant, cela implique une intégration complexe composée de nombreuses couches de matériaux (verre, silicone, adhésif, PDMS) pour superposer la culture et la détection (Figure I.24-B). Le système n'est pas

réutilisable car scellé à l'UV/ozone et le biocapteur ne peut être remplacé. Aucun protocole de régénération n'est mentionné, donc le système microfluidique est à usage unique et ne permet pas un long suivi dans le temps. L'architecture du système microfluidique est minimaliste et est composée de deux canaux superposés encadrant la culture (Figure I.24-C et D). Le canal supérieur permet l'injection du milieu de culture et le canal inférieur est en contact direct avec le biocapteur. Une pompe péristaltique permet l'injection en continu du milieu de culture. Aucune automatisation intégrée n'est présente.

De manière générale, la plateforme complète est utilisable dans un incubateur, permettant le maintien des conditions physiologiques de la culture (Figure I.24-E). Cependant, bien que la plateforme valide de nombreux critères, notamment vis-à-vis du biocapteur et de l'intégration sous la culture, le système présente des limitations en termes de réutilisation, de simplicité d'assemblage et d'automatisation pour obtenir une plateforme robuste (Figure I.24-A).

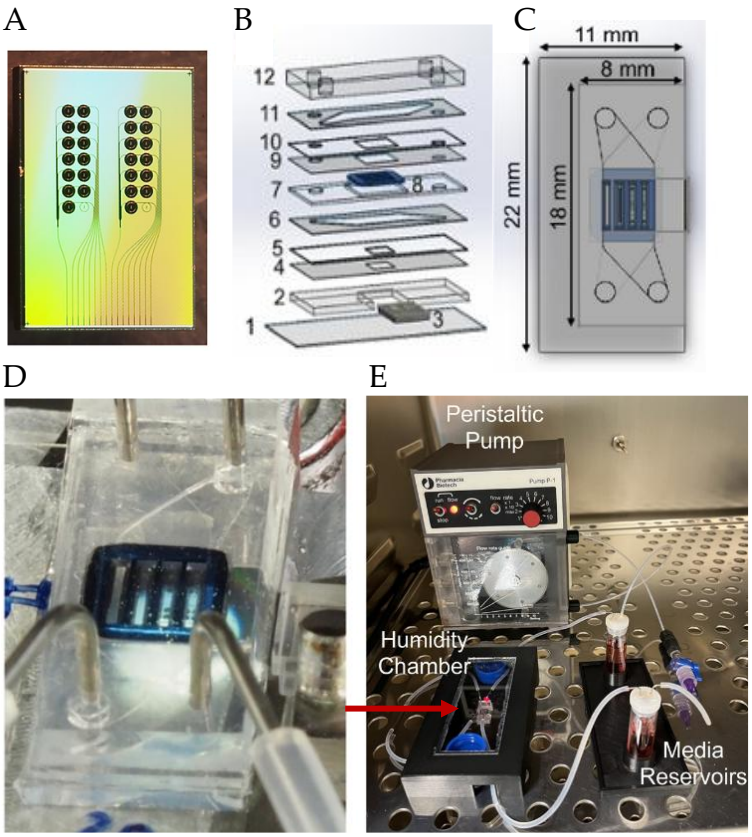


Figure I.24 : Plateforme microfluidique développée par Cognetti et al. couplant un biocapteur photonique à anneaux résonants à un modèle d'épithélium bronchique, A- Photographie du biocapteur photonique, B- Vue éclatée de l'assemblage du système microfluidique : 1) lamelle de verre de 170 µm, 2) support du biocapteur photonique de 762 µm, 3) biocapteur photonique, 4) couche d'étanchéité adhésive de 57 µm, 5) couche d'étanchéité en silicone de 127 µm, 6) canal inférieur adhésif de 127 µm, 7) support de 300 µm, 8) Membrane nanoporeuse à quatre fentes, 9) couche d'étanchéité de membrane adhésive de 57 µm, 10) couche d'étanchéité en silicone de 100 µm, 11) canal supérieur adhésif de 127 µm et 12) capuchon PDMS d'environ 2 mm avec entrées et sorties, C- Vue de dessus de la puce microfluidique [131].

Au sein du laboratoire LSMB au CEA Leti, les chercheurs travaillent sur le développement d'une plateforme microfluidique pour la culture d'organoïdes de pancréas ou d'îlots pancréatiques provenant de donneurs. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux plateformes étudiant ce type de modèle.

En 2021, Ortega et *al.* ont développé une plateforme microfluidique constituée de deux systèmes microfluidiques en PDMS distincts : un pour la culture d'îlots pancréatiques murins et un second intégrant un biocapteur LSPR pour la détection des sécrétions d'insuline induites par une stimulation au glucose (Figure I.25-A), [132]. Le biocapteur, constitué de 8 zones de détection, permet une mesure sans marquage toutes les 30 minutes, avec une limite de détection de 0,85 µg/mL, compatible avec les organoïdes étudiés. Le système de détection est composé de 8 canaux de détection individuellement adressables grâce à l'intégration de vannes pneumatiques de Quake qui assurent l'automatisation du protocole fluidique à l'aide d'une pompe péristaltique. Ces 8 canaux permettent de réaliser jusqu'à 4 réplicats (Figure I.25-B). Les deux systèmes microfluidiques sont reliés par des tubulures, ce qui introduit des volumes morts et une latence dans la détection de l'insuline. De plus, le module de culture ne comporte pas de micro-vannes et repose sur le contrôle d'une pompe péristaltique. L'intégration du biocapteur dans le système microfluidique repose sur un scellement par plasma O_2, simple à mettre en œuvre mais non réversible.

Dans son ensemble, la plateforme a permis un suivi automatisé des sécrétions d'insuline, de manière ininterrompue pendant 3 heures. Elle valide donc une grande partie des critères, mais présente des limites liées aux volumes morts, à l'intégration non réversible ainsi qu'à la maintenance et au nombre des connectiques, qui affectent sa robustesse.

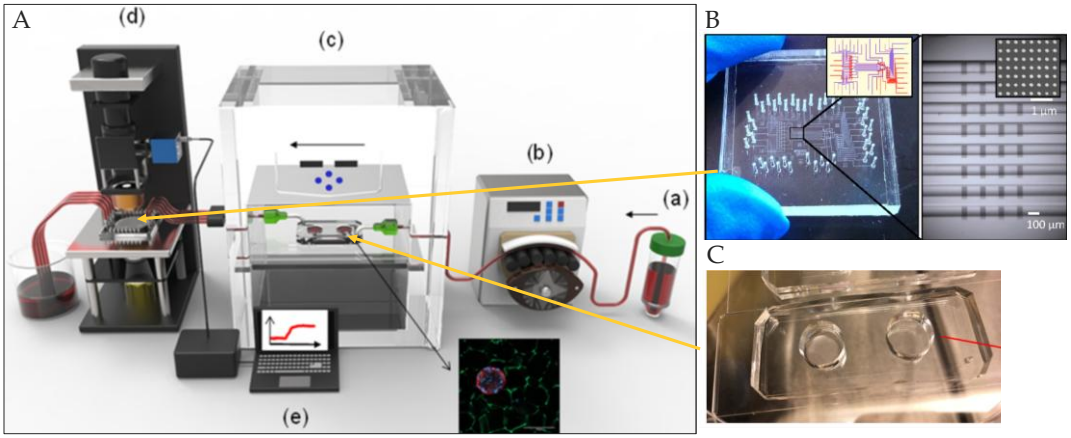


Figure I.25 : Plateforme microfluidique développée par Ortega et al. pour la culture d'îlots pancréatiques murins et la détection des sécrétions d'insuline avec un biocapteur LSPR, A- Vue schématique de l'intégration du dispositif d'îlots-sur-puce avec la plateforme de détection LSPR-sur-puce. (a) Tampon KRBH avec une teneur en glucose choisie ; (b) une pompe péristaltique pour introduire le tampon dans l''îlot-sur-puce, (c) Ilots-sur-puce contenant des îlots de souris intégrés dans une matrice à base de cellulose ; (d) plateforme LSPR pour la détection d'insuline dans les sécrétions de l'îlots-sur-puce, (e) suivi de la détection des sécrétions d'insuline [132].

Fernández-Costa et *al.*, quant à eux, proposent une plateforme multi-organes-sur-puce associant un muscle squelettique avec des pseudo-îlots pancréatiques β (Figure I.26-A), reliés à un second système microfluidique de détection (Figure I.26-C) [133]. Il intègre un biocapteur SPR qui permet de surveiller, en temps réel et sans marquage, la sécrétion de myokines (sécrétées après un stimulus via des électrodes) et leur effet sur la production d'insuline par les cellules β, également mesurée en parallèle (Figure I.26-B). Les électrodes, permettant la contraction musculaire, sont directement intégrées dans la chambre de culture du muscle squelettique. L'analyse est réalisée en flux continu toutes les 20 minutes avec des limites de détection de 0,01 ng/mL et de 0,02 ng/mL respectivement pour les myokines et l'insuline. Le biocapteur est fixé à un capot en PMMA de 2 mm avec des ports d'entrée et de sortie grâce à un adhésif double face qui forme le microcanal fluidique avec les deux zones de détection (Figure I.26-B). Cette intégration très simple ne permet pas une réutilisation du système. Aucune microvanne n'est intégrée dans les modules fluidiques, qui sont seulement contrôlés à l'aide d'une pompe péristaltique. Comme pour le système d'Ortega et *al.*, la plateforme sépare la partie culture et détection, rajoutant des tubulures et augmentant les volumes morts.

Ainsi, cette plateforme valide de nombreux critères, dont le multiplexage, une sensibilité élevée et une intégration simple, mais présente des limitations en termes d'intégration réversible, de gestion fluidique, de volumes morts et de miniaturisation (Figure I.26-C). Cependant, cette plateforme est très prometteuse pour une étude biologique poussée, avec la culture de plusieurs modèles biologiques et la réalisation de stimulations influençant directement les sécrétions.

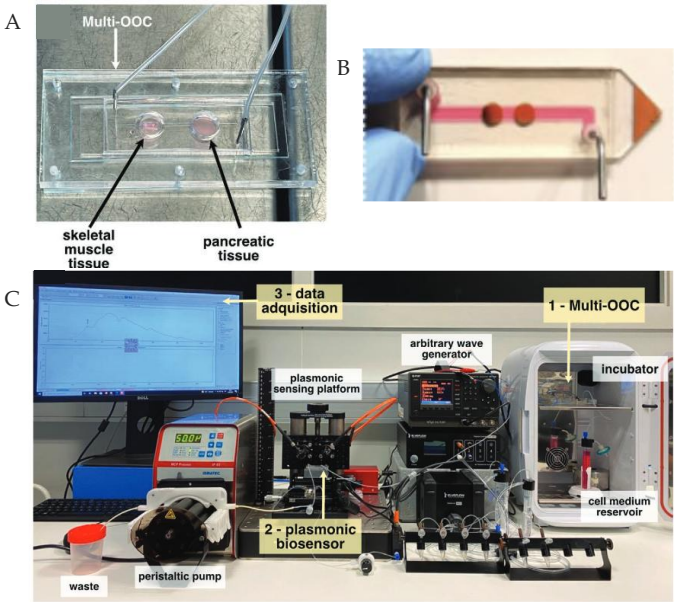


Figure I.26 : Plateforme optofluidique développée par Fernández-Costa et al. et composée d'un module de culture et d'un module de biodétection A-Multi-organes-sur-puce avec les muscles squelettiques et les tissus pancréatiques dans leurs chambres respectives, B- Système microfluidique en PDMS intégrant un biocapteur plasmonique multiplexé pour la surveillance de la sécrétion d'IL-6 et d'insuline, C- Photographie du dispositif expérimental complet intégrant le dispositif Multi-organes-sur-puce à la plateforme de détection plasmonique. [133]

Globalement, les plateformes analysées précédemment valident les critères de détection sans marquage, multipoints, avec des performances analytiques élevées. Certaines se distinguent par leur sensibilité (Fernández-Costa et *al.*,), leur automatisation (Shin et *al.*, Ortega et *al.*), par une intégration directe du capteur sous la culture (Cognetti et *al.*) ou par la possibilité de régénérer le capteur (Shin et *al.*). Toutefois, aucune ne combine simultanément multiplexage, régénération ou interchangeabilité du capteur, intégration compacte et automatisation. La séparation fréquente du module de culture et du module de détection pénalise la compacité et la sensibilité de détection des sécrétions faiblement concentrées. Cependant, cette configuration permet d'isoler uniquement le module de culture dans un incubateur, ce qui constitue un avantage pour éviter toute incompatibilité avec l'électronique ou les bancs de détection. Ainsi, même si de nombreux verrous technologiques ont été levés individuellement, l'aboutissement à une plateforme totalement intégrée, robuste, automatisée et directement exploitable par les biologistes, sans contrainte supplémentaire, reste une étape déterminante pour une adoption de tels systèmes en routine expérimentale.

I.6 Discussion

Le passage d'un biocapteur type « démonstrateur de laboratoire » à un système intégré et opérationnel dans un contexte applicatif reste un véritable enjeu. Le développement de ce type de plateforme requiert des compétences pluridisciplinaires en chimie, physique, biologie et ingénierie, souvent interdépendantes. De plus, même si la méthode de transduction est optimisée, les performances du système restent dépendantes d'un ensemble de facteurs multiparamétriques.

La fonctionnalisation de surface constitue un élément clé dans la conception de biocapteurs. En effet, les performances du transducteur ne peuvent être exploitées que si l'interface biorécepteur/surface du capteur assure une capture efficace, stable et sélective des analytes**.** Comme l'expliquent Puumala et *al.*, la densité, l'orientation et la stabilité des biorécepteurs immobilisés dépendent de la fonctionnalisation qui conditionne la limite de détection mais aussi la linéarité et la répétabilité des résultats [108]. Pour des capteurs à base d'oxyde de silicium, la silanisation de surface est très souvent utilisée pour la fonctionnalisation. Il a été démontré que de faibles variations dans la silanisation (nature du solvant, concentration, température, humidité ambiante) peuvent conduire à des différences significatives dans les performances du biocapteur. De plus, un protocole, déjà mis en place avec une première cible, n'est pas forcément transposable directement avec une autre et peut exiger une réoptimisation complète, souvent coûteuse en temps et en matériaux [134]. Il a été observé qu'en optimisant le protocole de fonctionnalisation, un biocapteur peut voir sa spécificité augmenter, notamment avec une fonctionnalisation orientée et une passivation de surface efficace qui empêche l'absorption non spécifique des molécules et réduit le bruit de fond [117], [135]. La chimie de surface est donc un paramètre essentiel à optimiser pour obtenir des biocapteurs performants. Cependant, même si la surface présente une densité adéquate de biorécepteurs correctement orientés, la capture de l'analyte peut ne pas être pleinement efficace. Celle-ci dépend en effet d'autres facteurs. La nature et le type de biorécepteur peuvent influencer les performances de biocapture car deux biorécepteurs du même type ayant la

même cible peuvent réagir différemment en fonction du mode de production et du fournisseur, entraînant des variations de spécificité ou d'affinité avec la cible. Or, l'affinité du biorécepteur pour l'analyte est un paramètre déterminant car une forte affinité favorise la formation de complexes stables et augmente la probabilité de capture, même pour une faible concentration d'analyte. Le choix du biorécepteur est donc très important car celui-ci influence directement la sensibilité intrinsèque du système [136]. Il en est de même pour la cible d'intérêt, car en fonction du milieu (simple ou complexe) dans lequel elle se trouve, cela peut influencer le résultat. La mise en contact de l'échantillon avec le biocapteur est également une étape clé. L'administration précise de l'échantillon permet de fiabiliser les mesures et d'améliorer la reproductibilité ainsi que les performances du dispositif [122], [123]. À l'inverse, une intégration fluidique inadaptée peut influencer négativement les performances du biocapteur. Plusieurs phénomènes, tels que l'apparition de bulles, de gradients de concentration, l'absorption non spécifique sur les matériaux ou un débit instable, peuvent perturber l'interaction biomoléculaire et diminuer les performances de biocapture et donc la sensibilité et la reproductibilité des résultats [108]. Il est donc nécessaire de concevoir des dispositifs microfluidiques robustes et automatisés afin de minimiser l'influence de ces facteurs.

Pour l'étude des organoïdes, de nombreux systèmes reposent sur des architectures dans lesquelles le biocapteur est positionné en aval de la zone de culture, séparé par plusieurs centimètres de tubulures. Cette configuration entraîne une dilution significative des analytes et une perte de résolution temporelle dans l'analyse des dynamiques de sécrétion. La diffusion des molécules dans le volume fluidique disponible retarde leur détection, et les signaux mesurés résultent alors d'un mélange entre la cinétique réelle de sécrétion, le temps de transit dans le dispositif et la diffusion. Il apparaît donc intéressant que les futurs organes-sur-puce intègrent des biocapteurs directement au plus près du tissu, non plus comme des modules séparés en aval, mais comme des éléments embarqués soumis uniquement à la diffusion locale [136]. L'intégration de biocapteurs dans des systèmes complexes, comprenant des composants microfluidiques, optiques et électroniques, reste difficile à mettre en place pour obtenir des dispositifs fiables et performants. Mai et *al.* soulignent notamment que les contraintes d'intégration (alignement micrométrique précis des fibres/guides, étanchéité des canaux microfluidiques sans altération des propriétés optiques et biochimiques, compatibilité des matériaux avec les solvants de biofonctionnalisation) constituent l'une des faiblesses majeures pour le développement de ce type de dispositif [137]. Pour faciliter le suivi des cultures d'organoïdes sur une longue période, la conception de dispositifs modulaires « plug-and-play », intégrant le biocapteur, serait un avantage pour le remplacer facilement. De tels dispositifs permettraient également la réduction des déchets en associant une plateforme principale réutilisable avec des modules jetables simples et rapides à assembler [79]. Cependant, l'absence de normes et standards industriels pour la co-intégration complique la conception de systèmes modulaires fiables et freine leur adoption à grande échelle.

Ces limitations soulignent la nécessité de développer des biocapteurs performants dans des systèmes robustes et compatibles avec des environnements complexes comme les organes-sur-puce.

I.7 Problématique et objectifs du projet de thèse

À partir des limitations identifiées dans le chapitre I, cette thèse s'inscrit dans la problématique du développement d'une plateforme optofluidique automatisée intégrant une culture d'organoïde, la récupération de ses sécrétions, et leur analyse par détection optique sans marquage, multiplexée et en temps réel. Le sujet de cette thèse consiste plus précisément à développer une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur optique pour une détection totalement automatisée et optimisée de biomolécules modèles dans un premier temps, puis d'insuline.

Ce projet a pour origine les travaux antérieurs de plusieurs doctorants. Les travaux de Nicolas Gaignebet ont notamment permis de développer un dispositif de biodétection par voie optique intégrant des capteurs à cristaux photoniques dans un système compact d'imagerie sans lentille au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) [98], [138]. En parallèle, Clément Quintard a conçu un dispositif microfluidique permettant la vascularisation de pancréas-sur-puce, tandis que Marie Hut a développé une méthode de récupération des sécrétions au sein du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives - Laboratoire d'Électronique et de Technologie de l'Information (CEA Leti, Grenoble) [61], [139]. Dans ce contexte, le projet de thèse est structuré en trois axes principaux : (1) La conception d'architectures microfluidiques intégrant un biocapteur optique. (2) Le développement d'un protocole de biodétection. (3) Le développement d'une fonctionnalisation de surface par voie liquide éco-responsable.

Plus précisément, de nouveaux capteurs à cristaux photoniques, composés de 14 zones de détection, ont été développés au CEA Leti et caractérisés en parallèle de ce sujet de thèse. Cependant, pour décorréler les difficultés éventuelles liées au développement des capteurs à cristaux photoniques et faciliter le développement de la plateforme optofluidique, une détection par fluorescence a été privilégiée dans le cadre de cette thèse. Le capteur de fluorescence mis en place est composé du même matériau de surface, conserve les mêmes dimensions et les mêmes zones de détection que les capteurs photoniques, afin de permettre une intégration future de ceux-ci au sein de la plateforme optofluidique.

Concernant les objectifs du premier axe, la conception de l'architecture microfluidique doit être composée de plusieurs canaux de détection indépendants compatibles avec la future intégration des capteurs à cristaux photoniques. La cartouche microfluidique doit intégrer le biocapteur de fluorescence tout en restant compatible avec la méthode de détection. Pour le second axe, la plateforme doit permettre l'automatisation complète du protocole de biodétection, incluant la gestion des échantillons, des réactifs et des étapes de lavage, pour obtenir une détection robuste et reproductible. Pour cela, les technologies microfluidiques développées du CEA Leti seront utilisées. Une phase de caractérisation du protocole sera ensuite menée en étudiant plusieurs paramètres influençant la biocapture de molécules cibles pour réaliser une première preuve de concept et pour obtenir un protocole optimisé. Pour mettre en place cette partie, une fonctionnalisation de surface développée au CEA Leti sera utilisée. Le dernier axe sera consacré au développement d'une silanisation de surface éco-responsable utilisant un solvant vert, l'éthanol, couplé à une fonctionnalisation par chimie

click permettant une orientation contrôlée des biorécepteurs. La plateforme optofluidique permettra d'évaluer l'efficacité de cette chimie en conditions de biocapture en flux.

À terme, ce travail permettra d'établir des briques de base essentielles au développement d'une plateforme optofluidique complète intégrant la culture de l'organoïde, la récupération de ses sécrétions, et leur analyse par détection optique sans marquage, multiplexée et en temps réel (Figure I.27).

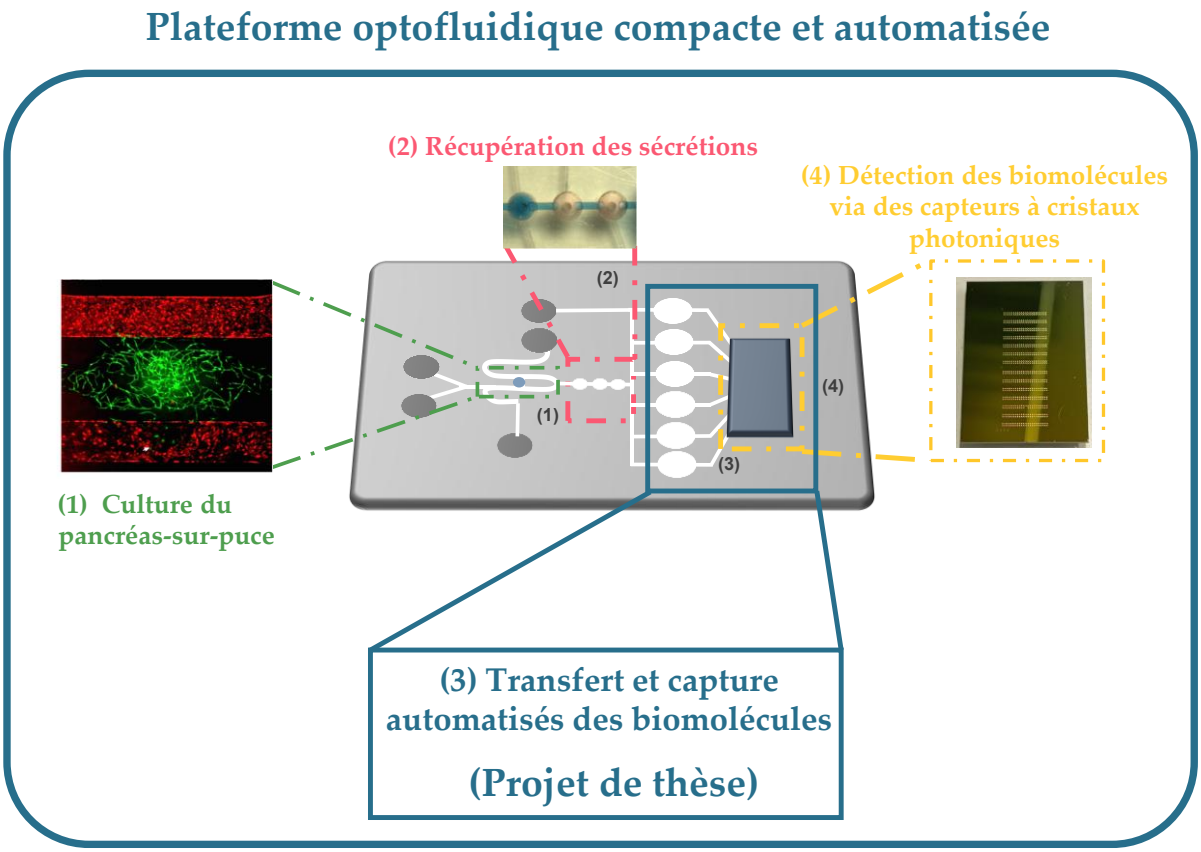


Figure I.27 : Vue schématique de la plateforme optofluidique finale intégrant la culture d'un organoïde de pancréas (1), la récupération de ses sécrétions (2), le transfert automatisé de ses sécrétions pour réaliser un protocole de biodétection (3) à partir d'une détection optique multiplexée en temps réel à l'aide d'un capteur à cristaux photoniques composé de 14 paires de lignes avec 22 cristaux photoniques offrant 14 zones de détection distinctes.

Résumé du Chapitre I

- Le développement de nouveaux médicaments et traitements a montré les limitations des méthodes de cultures cellulaires en 2D et des expérimentations animales. La culture cellulaire en 3D a donc permis de développer des modèles de culture plus complexes avec les organoïdes et sphéroïdes.

- La culture de ces nouveaux modèles dans des conditions statiques ne permet pas de reproduire l'environnement dynamique des tissus *in vivo*.

- La microfluidique est donc introduite comme une solution pouvant améliorer les cultures avec des microenvironnements contrôlés précisément et plus représentatifs des tissus *in vivo*. Plusieurs dispositifs sont présentés pour montrer les avantages de la combinaison de la microfluidique avec la culture cellulaire 3D.

- Le développement de plateformes de culture plus complexes a montré le besoin de travailler avec de nouvelles méthodes d'analyses pour permettre un suivi plus poussé des cultures sur le long terme.

- Les laboratoires-sur-puce ont montré de nombreux avantages avec l'intégration d'immunodosages, mais la complexité des architectures, leur encombrement et le temps de réponse empêchent de les utiliser pour un suivi des sécrétions des organoïdes.

- Les biocapteurs ont donc été introduits, présentant de nombreux avantages, notamment les biocapteurs optiques avec leur possibilité de multiplexage, leur détection rapide, parfois en temps réel et leur compatibilité avec la microfluidique grâce à leurs dimensions.

- Pour développer une plateforme compatible avec le suivi des organoïdes, plusieurs critères sont à prendre en compte tels que la compacité et l'automatisation du système, une microfluidique intégrée pour la gestion de plusieurs réactifs. L'intégration du biocapteur dans un système est l'un des paramètres les plus importants car cette intégration doit être simple, robuste, étanche, idéalement réversible et au plus près de la culture d'organoïdes.

- Comme peu de systèmes dans la littérature combinent tous les nombreux critères d'intégration, le sujet de cette thèse repose donc sur le développement d'une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur optique de fluorescence pour la biodétection des sécrétions d'insuline d'organoïdes de pancréas.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Introduction

Ce second chapitre présente l'ensemble des méthodes et des protocoles mis en place au cours de cette thèse pour le développement de la plateforme optofluidique. Tout d'abord, le type de biocapteur utilisé est présenté ainsi que les deux stratégies de fonctionnalisation de surface mises en œuvre pour sa conception. La technologie microfluidique retenue pour ce travail est également décrite, ainsi que le banc d'expérimentation modulaire spécifiquement adapté pour ce projet. Et finalement, les méthodes d'acquisition et de traitement des données sont présentées.

II.1 Élaboration du biocapteur

II.1.1 Caractéristiques du biocapteur

Les biocapteurs sont développés à partir d'un wafer en silicium, oxydés thermiquement à 950 °C pour former une couche d'oxyde de 100 nm à leur surface. Les wafers sont ensuite découpés en substrats individuels rectangulaires de 18 mm x 25,3 mm pour l'intégration au sein de la cartouche fluidique. Ces substrats doivent ensuite être fonctionnalisés avec des biorécepteurs pour permettre la biocapture spécifique de cibles d'intérêt. Dans notre cas, le biocapteur mis en place est un immunocapteur qui utilise des anticorps comme sondes biologiques et la fluorescence comme méthode de transduction.

Pour ce projet de thèse, il a été décidé de réaliser une détection de la fluorescence en utilisant des cibles directement couplées à un fluorophore. C'est pourquoi un couple modèle d'anticorps polyclonaux a été choisi : les anticorps de lapin anti-E. coli (Abcam, Pays-Bas) qui ont été validés antérieurement en tant que biorécepteurs et les anticorps de chèvre anti-lapin marqués par le fluorochrome AlexaFluor 488 nm (AF488), (Oxyme, France) utilisés en tant que cibles fluorescentes. Le fluorochrome AlexaFluor a été sélectionné pour sa très bonne photostabilité [140]. Un récapitulatif est présenté sur la Figure II.1 avec le principe de la biocapture.

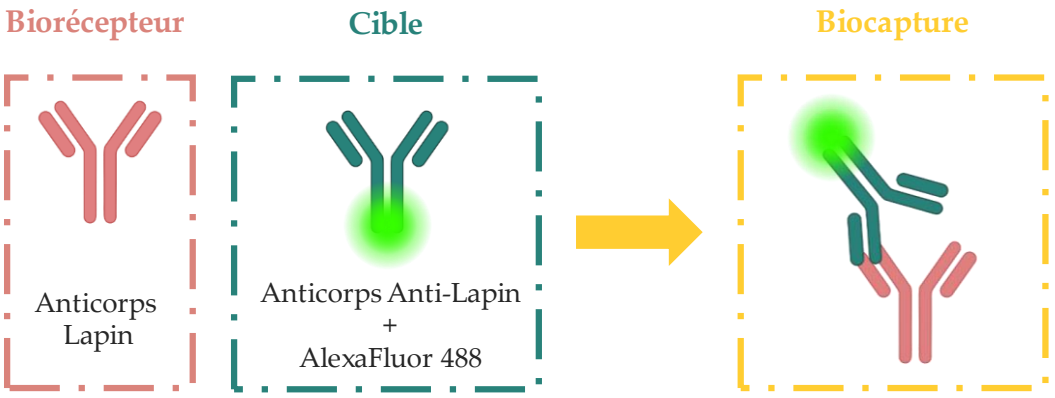


Figure II.1 : Biorécepteur et cible choisis pour le développement de la plateforme optofluidique.

Ce sont donc les anticorps lapin (E. coli) qui seront immobilisés sur la surface du capteur, en tant que biorécepteurs dans les 7 zones de détection (Figure II.2). Pour immobiliser efficacement ces anticorps sur la surface de silicium, une fonctionnalisation de surface est nécessaire. Les protocoles de fonctionnalisation de surface utilisés lors de cette thèse sont présentés dans la section suivante.

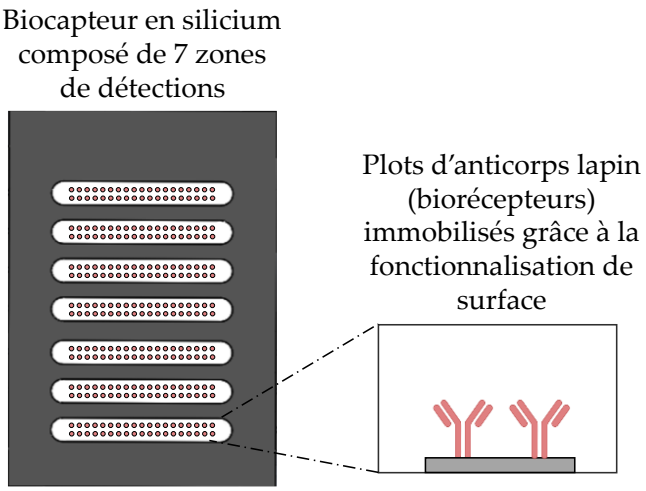


Figure II.2 : Illustration du biocapteur en silicium composé de 7 zones de détection. Les anticorps lapin de capture sont immobilisés dans ces zones de détection à partir de fonctionnalisation de surface.

II.1.2 Fonctionnalisation chimique de la surface du capteur en silicium

La fonctionnalisation chimique de surface du capteur est une étape clé dans l'élaboration d'un biocapteur. En effet, l'immobilisation des biorécepteurs sur le substrat nécessite souvent une couche chimique permettant de stabiliser et d'optimiser l'immobilisation (covalente ou non) et ainsi d'améliorer les performances du biocapteur. Pour ce projet de thèse, les anticorps sont immobilisés de façon covalente sur le capteur en silicium, préalablement fonctionnalisé par une couche de silane. Deux méthodes de silanisation ont été étudiées.

La première méthode a été développée dans le laboratoire PRISM du DTIS au CEA Leti. Il s'agit d'une silanisation en phase gaz déjà optimisée permettant une immobilisation covalente et non orientée des anticorps. Elle a été principalement utilisée pour développer le protocole d'immunodétection de la plateforme optofluidique présentée dans le chapitre IV.

La seconde méthode a été développée pendant cette thèse et lors du stage de Master 2 de Mme Yvana Kouatche. Il s'agit d'une silanisation en phase liquide utilisant un solvant « vert », l'éthanol, afin de réduire l'impact écologique de la silanisation en phase liquide. Par la suite, les anticorps sont immobilisés de manière covalente et orientée grâce à une réaction de chimie click. Plusieurs tests, présentés dans le chapitre V, ont été réalisés et ont permis de mettre en place le protocole final de silanisation en phase liquide présenté ci-dessous.

i. Silanisation en phase gaz du capteur en silicium

- Produits et réactifs chimiques :

Le silane 5,6-epoxyhexyltriethoxysilanes (EHTES), (97 %) a été acheté auprès de abcr (CAS 86138-01-4). Le métapériodate de sodium ($NaIO_4$, ≥ 99 %) et l'hydroxyde de sodium (NaOH, ≥ 97 %) ont été achetés auprès de Sigma Aldrich. L'acide sulfurique (H_2SO_4, 96 %) a été acheté auprès de KMG Chemicals et l'éthanol (96 %) auprès de Carlo Erba.

- Protocole de silanisation en phase gaz :

Le protocole de silanisation mis au point au sein du laboratoire PRISM a été spécifiquement développé pour la conception de biocapteurs et utilise le 5,6-epoxyhexyltriethoxysilane (EHTES) comme organosilane [141], [142], [143] (Figure II.3- étape 1). Un procédé de dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition, CVD) du silane est réalisé avec l'instrument EcoCoat (Yield Engineering System, USA).

Tout d'abord, un nettoyage des substrats Si dans une solution éthanolique (57 %) d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,1 M (traitement Brown) est réalisée sous ultrasons pendant 30 min. Les substrats sont ensuite rincés abondamment à l'eau osmosée puis séchés par centrifugation à 1000 rpm pendant 8 min. Ils sont ensuite placés dans l'équipement EcoCOAT, pour une activation de la surface, sous vide (0,5 Torr), au plasma O_2 à 200 W pendant 5 min à 150°C [120]. Une purge à l'azote est ensuite réalisée dans le système. Le dépôt du silane est effectué selon un cycle de 4 étapes à une température de 150°C, réalisé trois fois :

a. Injection d'eau osmosée pendant 5 min (lorsque le vide atteint 300 mTorr).
b. Purge à l'azote.
c. Injection du silane pendant 30 min (lorsque le vide atteint 300 mTorr).
d. Purge à l'azote.

Après le dernier cycle, une purge finale à l'azote est effectuée. Un contrôle interne au laboratoire est réalisé avec la mesure de l'angle de contact des substrats silanisés qui doit être de 75 °± 3 ° pour valider la silanisation.

Une fois le dépôt appliqué, une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) est utilisée pour ouvrir l'époxyde se trouvant à l'extrémité de la chaîne du silane EHTES (Figure II.3-étape 2). Cette action permet de stabiliser les silanes sur la surface grâce à la formation de diol, une fonction beaucoup plus stable que l'époxyde (Figure II.3- étape 3). Cette ouverture est réalisée en immergeant les substrats dans un bain d'acide sulfurique à 5 % pendant 2 heures sous faible agitation. Ils sont ensuite rincés à l'eau osmosée avec l'instrument Quick Dump Rinse (QDR) puis séchés par centrifugation à 1000 rpm pendant 10 min. Cette modification permet de conserver au moins un mois les substrats silanisés dans une chambre sous azote. Après ouverture de l'époxyde, une nouvelle mesure de l'angle de contact est réalisée et doit être de 40°± 10° d'après le contrôle interne.

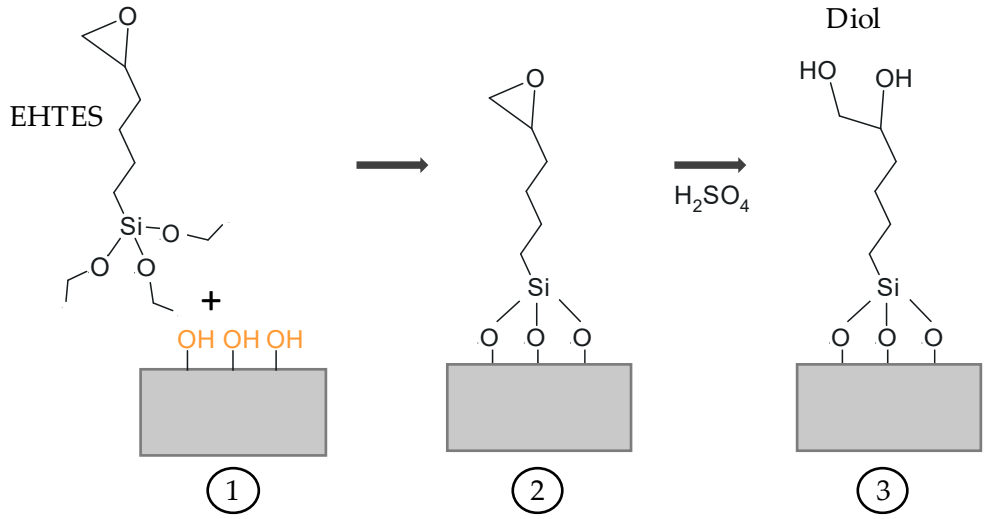


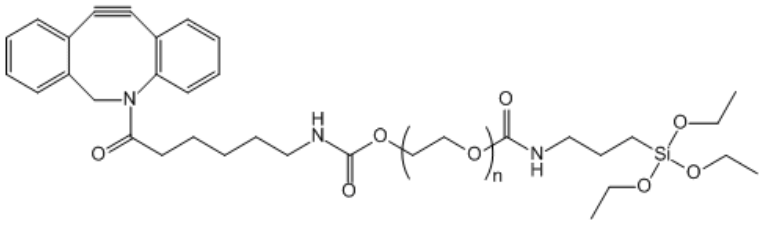
Figure II.3: 1- Dépôt chimique en phase gaz du silane EHTES, 2- Réaction de condensation entre le silane et la surface oxydée du capteur formant une liaison covalente, 3 - Ouverture du groupement époxy pour former des diols stables à partir d'une solution d'acide sulfurique.

ii. Silanisation en phase liquide du capteur en silicium

- Produits et réactifs chimiques :

Le silane-PEG2000-OH (≥ 95 %) et le silane-PEGx-DBCO (Figure II.4) de masse molaire 3400 g/mol et 2000 g/mol (≥ 95 %) ont été achetés auprès de Biochempeg. L'acide acétique glacial (≥ 99 %), l'acétone (≥ 99,5 %) et l'éthanol (≥ 99,50 %) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich. Les structures chimiques des différents silanes utilisés sont présentées sur la Figure II.4.

1 - Silane-PEG-DBCO (triéthoxysilane-polyéthylène glycol-dibenzocyclooctyne)



2 - Silane-PEG-OH (triéthoxysilane-polyéthylène glycol-hydroxy)

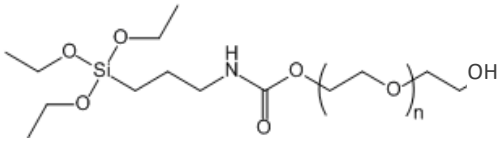


Figure II.4 : Structures chimiques des deux silanes utilisés, (1) Le silane-PEG-DBCO pour la réaction de chimie click, (2) Le silane-PEG-OH utilisé comme diluant.

- Protocole de silanisation en phase liquide :

Dans un premier temps, il faut préparer les réacteurs en téflon dans lesquels aura lieu la réaction de silanisation. Ces réacteurs sont nettoyés à l'eau déionisée puis remplis d'acétone et déposés dans un bain à ultrasons pendant 5 min, puis rincés à l'eau déionisée. Ils sont ensuite séchés à l'azote (Figure II.5.1). Les substrats sont également nettoyés dans un bain à ultrasons, en les immergeant 10 min dans de l'acétone puis 10 min dans de l'eau déionisée. Ils sont ensuite séchés à l'azote (Figure II.5.2). Une activation de la surface est réalisée à l'aide d'un instrument d'UV-ozone, actionné à vide pendant 15 min pour nettoyer la zone de dépôt, puis avec les échantillons pendant 30 min (Figure II.5.3). Les solutions de silanes sont préparées à partir de silane-PEG-DBCO et de silane-PEG-OH en poudre, le silane-PEG-DBCO portant le groupement réactif impliqué dans la méthode d'immobilisation des anticorps, tandis que le silane-PEG-OH agit comme diluant non réactif. En fonction de la concentration et du ratio de silanes souhaités, un mélange des deux silanes est pesé à l'aide d'une balance puis dissout dans une solution de 5 mL d'éthanol anhydre contenant 0,14 % d'acide acétique dans les réacteurs. Pour améliorer la dissolution, les solutions sont plongées dans un bain à ultrasons pendant 10 min (Figure II.5.4). Une fois les solutions homogènes, les substrats sont immergés dans les réacteurs. Une incubation de 6 h est réalisée. Après incubation, les substrats sont immergés dans une solution aqueuse contenant 6 % d'acide acétique pendant 15 min (Figure II.5.5). Ils sont ensuite rincés à l'eau déionisée. Un recuit est effectué pendant 1 h à 80 °C dans une étuve sous air ambiant. Finalement, les substrats sont immergés dans de l'éthanol pendant 2 x 5 min avec renouvellement de l'éthanol, puis rincés à l'eau déionisée et séchés délicatement sous azote (Figure II.5.6).

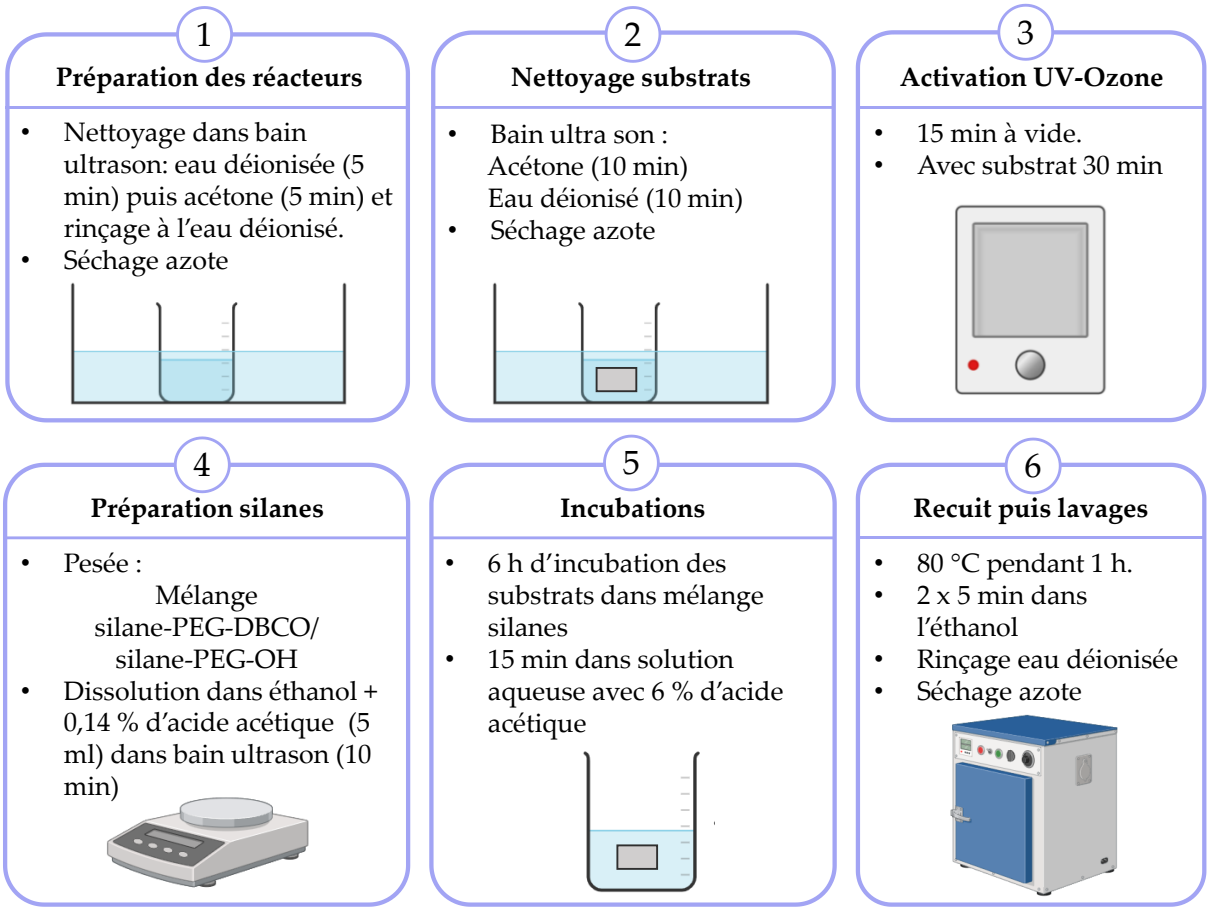


Figure II.5 : Étapes du protocole de silanisation en phase liquide.

iii. Immobilisation des anticorps

Les réactions chimiques permettant l'immobilisation des anticorps sur la surface des substrats ne sont pas les mêmes pour les deux méthodes de silanisation.

- Immobilisation des anticorps sur les surfaces silanisées en phase gaz avec l'EHTES

Pour immobiliser de façon covalente les anticorps sur la surface du capteur, une étape d'activation de la surface est nécessaire. Pour cela, les substrats silanisés sont immergés dans une solution aqueuse de $NaIO_4$ (0,1 M) pendant une heure sous agitation orbitale, puis trois rinçages à l'eau osmosée de 5 min sont effectués avant le séchage par centrifugation (1500 rpm, 5 min). Cette étape permet d'oxyder le diol en un aldéhyde (Figure II.6). Cette activation est à effectuer le jour de l'immobilisation des anticorps.

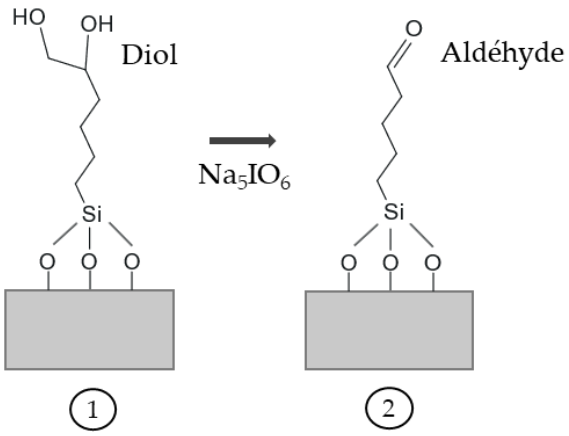


Figure II.6 : Activation de la surface par le métapériodate de sodium ($NaIO_4$) permettant d'obtenir une fonction aldéhyde (2) à partir d'une fonction diol (1).

Les groupements aldéhydes, recouvrant la surface des substrats Si, ont une affinité avec les amines primaires (NH_2). Ces amines sont disponibles partout sur les anticorps et forment avec les aldéhydes des liaisons covalentes imines (C=N). La réaction n'est donc pas spécifique à une zone de l'anticorps. Cela signifie que seulement une partie des anticorps sont favorablement orientés pour capturer leurs antigènes pendant que d'autres ont une orientation beaucoup moins favorable, comme on peut le voir sur la Figure II.7 (étapes 3 à 4 et 5).

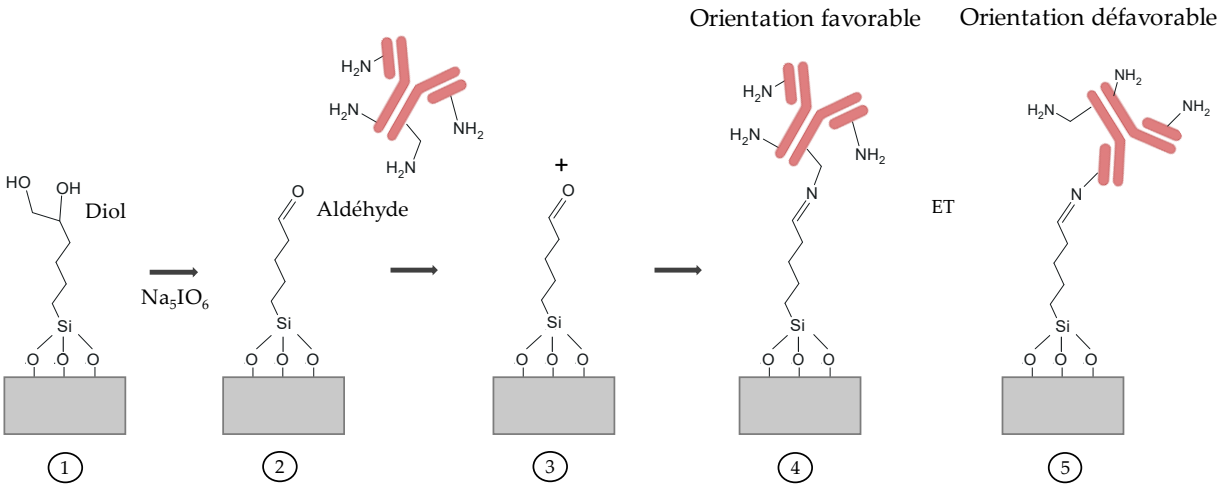


Figure II.7 : Étapes de l'immobilisation covalente des anticorps sur la surface silanisée, 1 à 2 : oxydation du diol en un aldéhyde, 2 à 3 : Interaction entre les anticorps présentant des fonctions amines et la surface fonctionnalisée par des groupements aldéhydes réactifs. – 4 et 5 : Immobilisation covalente aléatoire des anticorps sur la surface silanisée, avec des orientations favorables ou non à la biocapture.

- Immobilisation des anticorps par chimie click sur les surfaces silanisées en phase liquide avec les silane-PEG-DBCO et silane-PEG-OH.

Pour que la réaction de chimie click ait lieu entre les anticorps de capture (biorécepteurs) et la surface silanisée, les anticorps doivent être préalablement modifiés en introduisant des groupements azotures (R-N) au niveau de la partie saccharidique des chaînes lourdes. Cette

modification est réalisée à partir d'un kit spécifique (SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit, Invitrogen). Les étapes de la modification sont décrites sur la Figure II.8. Les anticorps modifiés avec un azoture peuvent ensuite être liés de manière covalente à la surface des substrats par réaction de chimie click.

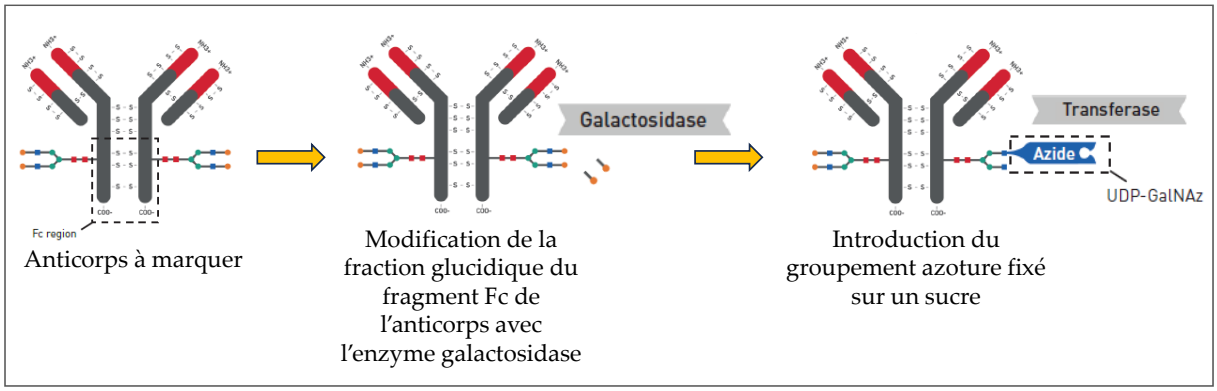


Figure II.8 : Étapes de la modification de l'anticorps avec l'ajout d'un azide. Représentation schématisée adaptée du protocole du kit SiteClick™.

Après la silanisation en phase liquide, la surface des substrats est recouverte d'une couche de silanes dont certaines présentent un groupement dibenzocyclooctyne (DBCO) en bout de chaîne. Les groupements DBCO réagissent spécifiquement avec des azotures comme ceux substitués sur l'anticorps. Cette réaction chimique forme une fonction triazole stable comme le montre la Figure II.9, et permet d'orienter favorablement les anticorps immobilisés sur la surface du biocapteur.

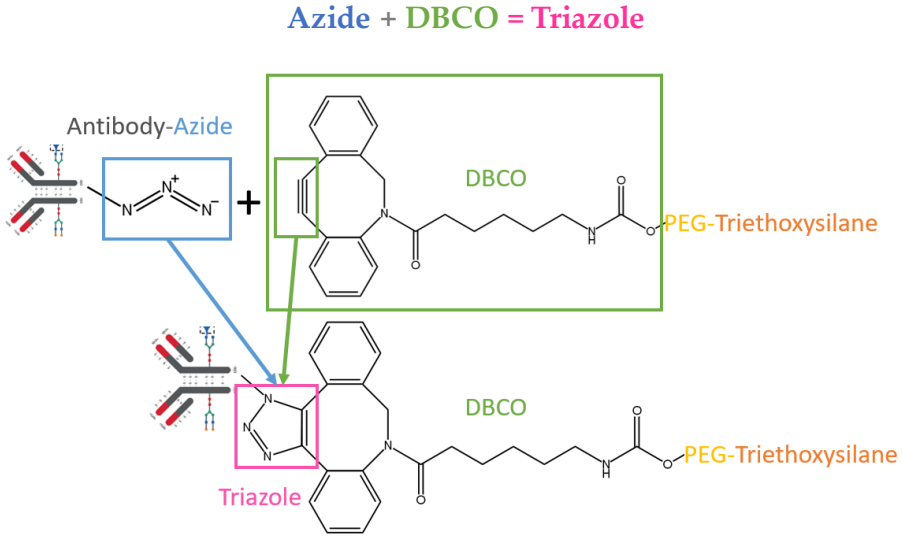


Figure II.9 : Réaction de chimie click SPAAC entre l'azide greffé à l'anticorps et le DBCO en bout de chaîne des silanes greffés sur la surface du biocapteur formant une liaison covalente triazole.

- Dépôt des anticorps

Le dépôt des anticorps sur les surfaces silanisées et activées est réalisé au moyen d'un équipement de distribution automatisé sans contact (SciFlexarrayer S3, Scienion). Cet appareil, basé sur la technologie piézoélectrique, permet l'éjection de gouttelettes d'un volume allant de 30 à 800 pL grâce à une buse (70 µm de diamètre interne) avec une précision inférieure à 5 µm (buse PDC 70 Piezo Dispense Capillary Uncoated, Scienon). Pour chaque plot, 3 gouttelettes de 330 pl, soit un volume total de 990 pl, d'une solution d'anticorps à 1 mg/mL, sont déposées. La taille des plots varie en fonction du tampon des solutions d'anticorps. Pour la fonctionnalisation via les fonctions amines, les anticorps sont dans du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) et les plots font environ 250 µm de diamètre. Pour la fonctionnalisation par chimie click, les anticorps sont dans du Tris 1X et font environ 150 µm de diamètre. Le plan de dépôt est présenté sur la Figure II.10 avec 7 zones de détection au lieu de 14 suite aux résultats présentés dans le chapitre III.

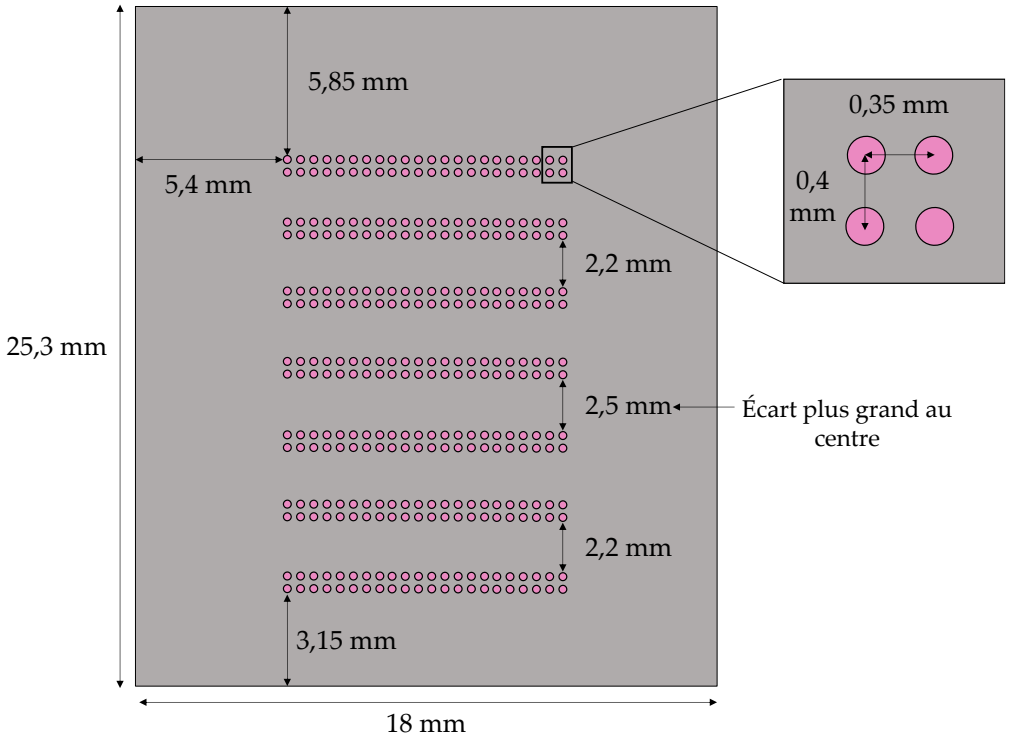


Figure II.10 : Plan de dépôt des anticorps avec 7 zones de détection distinctes contenant chacune 44 plots.

Après ce dépôt d'anticorps, les puces sont placées au moins 16 h au réfrigérateur. Les puces fonctionnalisées en phase gaze sont déposées directement au réfrigérateur dans une boîte de Petri en verre. Pour les puces fonctionnalisées par phase liquide, des gouttes d'eau osmosée sont déposées dans les boîtes de Petri pour réguler l'humidité (75-80 %) pour une incubation de 2 h à température ambiante avant de les mettre au réfrigérateur.

Un blocage dans une solution de PBS 1X BSA 1 % (bovine serum albumin) est ensuite effectué pendant 1 h sous micro-pulvérisateur (ZeptoFOG, Zeptosense). Cette étape vise à saturer les zones non fonctionnalisées du biocapteur afin d'éviter l'adsorption non spécifique

des cibles sur ces régions dépourvues de biorécepteurs. Après ce blocage de la surface, plusieurs rinçages sont réalisés :

Pour les puces fonctionnalisées en phase gaz : lavage pendant 10 min sous agitation dans une solution de PBS 1X Tween 20 à 0,1 %, puis 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X et un rinçage à l'eau osmosée pendant quelques secondes avant de sécher la puce à la centrifugeuse à 500 rpm pendant 10 min.

Pour les puces fonctionnalisées en phase liquide : lavage pendant 2 x 5 min sous agitation dans une solution de PBS 1X Tween 20 à 0,1 %, puis 2 x 5 minutes dans du PBS 1X et un rinçage à l'eau osmosée pendant quelques secondes avant de sécher la puce à la centrifugeuse à 500 rpm pendant 10 min.

Ces protocoles de biofonctionnalisation permettent de lier de manière covalente les anticorps de capture (biorécepteurs) à la surface des capteurs, afin d'obtenir des biocapteurs spécifiques. Après toutes ces étapes, les puces sont enfin opérationnelles et sont stockées dans une chambre sous azote jusqu'à leur utilisation.

iv. Méthodes de caractérisation de surfaces

- Angle de contact :

L'analyse de l'angle de contact (AC) permet d'évaluer la mouillabilité d'un liquide à la surface d'un solide. Le principe consiste à déposer une goutte sur la surface du substrat puis à analyser l'angle formé entre la surface solide et la tangente à la goutte. La forme de cette goutte dépend de la tension superficielle du fluide ainsi que de la nature de la surface (Figure II.11). L'angle obtenu permet donc de qualifier la surface : hydrophile lorsque 0 ° < AC < 90 °, ou hydrophobe lorsque 90 ° < AC < 180 ° [144]. Les mesures d'angle de contact ont été réalisées à température ambiante à l'aide d'un goniomètre GBX-Digidrop MCAT (France). Pour chaque mesure, une goutte d'eau déionisée de 0,80 µL est déposée sur la surface du substrat, puis l'angle est déterminé à l'aide du logiciel Visiodrop. Trois mesures ont été effectuées sur trois zones différentes pour chaque échantillon et leurs moyennes ont été calculées.

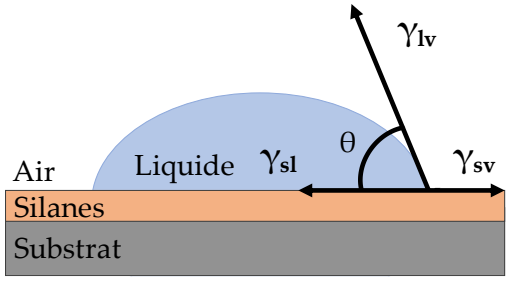


Figure II.11 : Principe de la mesure de l'angle de contact. L'angle de contact d'une goutte est défini par l'équilibre mécanique de la goutte sous l'action de trois tensions interfaciales : solide-vapeur, γ_{sv}*, solide-liquide,* γ_{sl}*, et liquide-vapeur,* γ_{lv}*. Cette relation d'équilibre est connue sous le nom d'équation de Young :* $\gamma_{sl}.cos\,\theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$ *, avec* θ_Y*, angle de contact de Young [145].*

- X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Le principe de la spectroscopie photoélectronique X est basé sur l'effet photoélectrique et permet d'obtenir la composition chimique de surface d'un solide avec une profondeur entre 1 nm et 10 nm [146]. Pour ce faire, la surface du solide est irradiée par des rayons X monochromatiques, ce qui entraîne l'émission des photoélectrons. À l'aide d'un spectromètre, l'énergie cinétique des photoélectrons émis est mesurée. Un spectre est réalisé à partir de ses mesures, composé de bandes discrètes. Les pics de ce spectre représentent la structure électronique des atomes présents à la surface du solide [147], [148]. Les mesures par XPS ont été réalisées sur la PlateForme de Nano-Caractérisation (PFNC) du CEA par Nicolas Gauthier avec un spectromètre à micro-sonde X Quantes dont les paramètres sont les suivants. Les échantillons ont été analysés dans une chambre à vide ultra poussée avec une source de rayons X monochromatique Al-Kα ($h\nu$ = 1486,6 eV) (taille du spot : 200 µm). L'angle de l'analyseur de source a été réglé à 45 ° pendant l'acquisition des données XPS, de même pour l'angle de décollage des photoélectrons, et la mesure a été réalisée sur une profondeur de 4,5 nm. La différence de potentiel ou énergie de passage (pass energy) a été fixée à 55 eV. La résolution énergétique est de 0,7 eV pour les spectres de niveaux de cœur. La calibration est effectuée en ajustant le pic C1s du carbone C-C/C-H à une énergie de liaison de 284,8 eV. Cette calibration ainsi que la décomposition des spectres ont été réalisées à l'aide du logiciel CasaXPS. Les concentrations atomiques ont été calculées à partir des facteurs de sensibilité relative (RSF, Relative Sensitivity Factors) standards fournis par la base de données de l'instrument. Un fond Shirley (Shirley background) a été soustrait de toutes les espèces d'intérêts et les pics ont été ajustés par rapport à une courbe pseudo-gaussienne. Cette analyse a été effectuée pour deux expérimentations distinctes, comprenant 6 conditions différentes de silanisation en phase liquide. Les résultats associés sont présentés dans le chapitre V.

II.2 Plateforme optofluidique pour la détection de biomolécules par fluorescence

II.2.1 Technologie microfluidique

Au sein du laboratoire LSBM au CEA Leti, une technologie pneumatique intégrée dans des cartouches microfluidiques a été développée depuis une dizaine d'années et a été présentée dans le chapitre I. Elle a permis la mise en œuvre de nombreux protocoles biologiques [87], [149].

i. Principe de la technologie de vannes pneumatiques

Cette technologie repose sur l'actionnement pneumatique d'une membrane hyper-élastique (polymère étirable thermodurcissable) au sein d'une cartouche microfluidique pour contrôler l'ouverture ou la fermeture de micro-vannes, intégrées dans un circuit fluidique. Ces cartouches sont composées d'une partie supérieure, le niveau fluidique, en contact direct avec

les liquides, et d'une partie inférieure, le niveau pneumatique, qui permet l'actionnement des micro-vannes. La membrane hyper-élastique sépare ces deux niveaux (Figure II.12).

À partir d'un contrôle en pression, l'interface pneumatique peut adresser une pression négative ou positive sous la membrane élastique, ce qui a pour action directe de la déformer, conduisant à l'ouverture ou à la fermeture des micro-vannes. Ainsi, lorsque la pression est négative, la membrane se colle contre la paroi de la couche pneumatique, ce qui a pour effet d'ouvrir les micro-vannes. À l'inverse, une pression positive va fermer ces vannes (Figure II.12.B). Chaque vanne dispose d'un contrôle en pression indépendant.

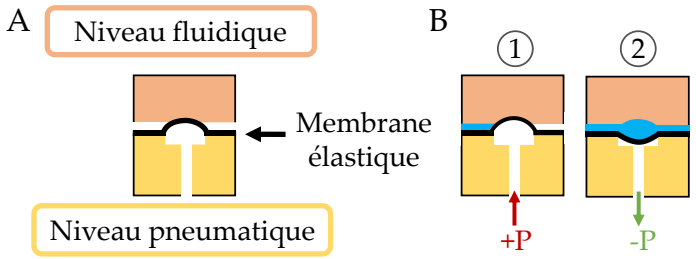


Figure II.12 : Vue schématique en coupe de la cartouche microfluidique composée de son niveau fluidique, de sa membrane élastique et de son niveau pneumatique et intégrant une micro-vanne. (1) Micro-vanne fermée sous l'effet d'une pression positive empêchant le liquide bleu de passer, (2) Micro-vanne ouverte sous l'effet d'une pression négative qui permet le passage du liquide.

Cette technologie microfluidique peut être couplée à plusieurs méthodes d'actionnement fluidiques qui seront présentées dans le chapitre III, ce qui permet d'effectuer des fonctions fluidiques élémentaires de manière automatisée.

ii. Fabrication de la cartouche microfluidique

Une cartouche est fabriquée à partir de copolymère d'oléfine cyclique, COC, et est au format « carte de crédit » (54 mm x 84 mm), conformément à la norme ISO 22916:2022. Elle est composée de 4 parties (Figure II.13) :

- Un niveau fluidique en COC de 3 mm composé de micro-canaux, d'entrées et de sorties fluidiques ainsi que de la partie supérieure des vannes dans lesquelles les fluides se déplacent.

- Une membrane hyper-élastique de 100 µm, interface entre les niveaux fluidique et pneumatique.

- Un niveau pneumatique en COC de 3 mm contenant la partie inférieure des vannes reliées au circuit pneumatique et qui permet l'actionnement de la membrane élastique.

- Un dernier niveau en COC de 1 mm qui fait le lien entre le niveau pneumatique et le système de contrôle en pression.

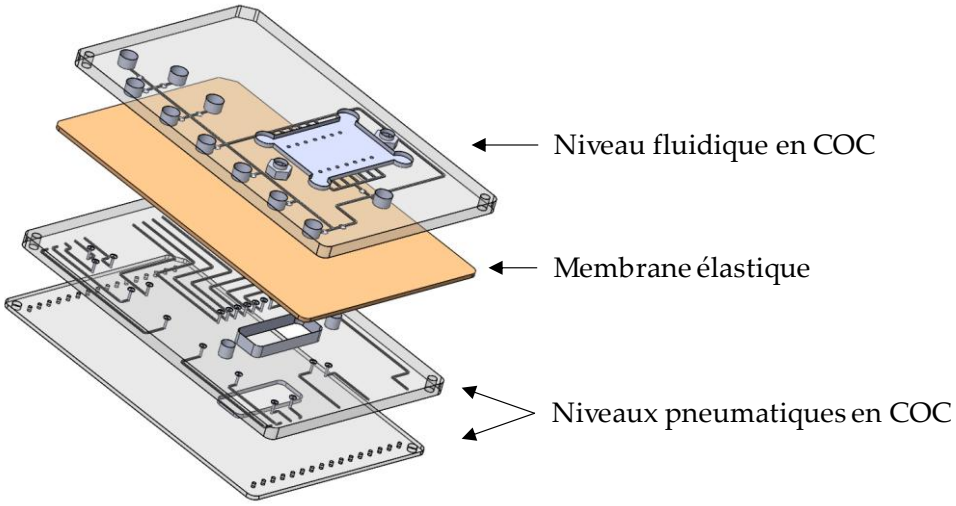


Figure II.13 : Vue éclatée d'une cartouche microfluidique composée d'une couche fluidique en COC, de la membrane élastique et des deux couches pneumatiques en COC.

La première étape dans la fabrication d'une cartouche microfluidique est la conception de l'architecture grâce à un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO), SolidWorks (Dassault Systèmes, France). Une librairie d'objets a été développée au sein du laboratoire LSMB au CEA Leti pour faciliter la conception des cartouches. Nous pouvons y retrouver les différents niveaux de la cartouche, les micro-vannes pneumatiques mais également les éléments d'entrée/sortie appelés « luers » qui sont compatibles pour l'insertion d'embouts fluidiques ou de seringues (Figure II.14). Ces dernières étant utilisées comme réservoir d'entrée.

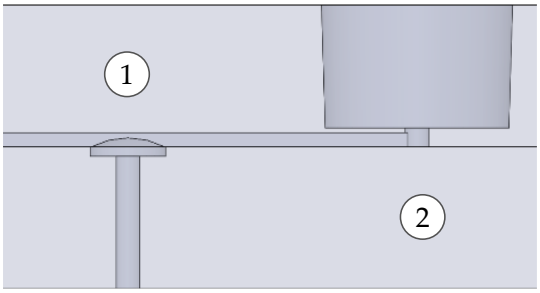


Figure II.14 : Vue en coupe d'une micro-vanne pneumatique (1) et d'un luer d'entrée/sortie (2).

Le développement de l'architecture de la cartouche microfluidique est détaillé dans le chapitre III. Les pièces de la cartouche microfluidique sont micro-usinées à partir de plaques de COC d'épaisseur théorique de 3 ou 1 mm et à l'aide de la fraiseuse 3D Datron M7HP (Datron, GE). Plusieurs fraises et forets sont utilisés afin d'usiner les éléments de la cartouche. Cette cartouche microfluidique est composée de micro-vannes d'un rayon de 0,8 mm et d'une profondeur de 0,2 mm et de canaux fluidiques de dimensions 0,3 x 0,3 mm. Ces dimensions sont les valeurs théoriques demandées lors de l'usinage. Cependant les éléments peuvent avoir des dimensions qui varient, notamment car le matériau est un dérivé du plastique. La Figure II.15 présente une plaque de COC usinée caractérisée à partir du profilomètre optique OPP ZIP 250. Pour une valeur théorique de profondeur de 0,3 mm, la valeur réelle mesurée

est de 0,2715 mm. Cette mesure est inférieure à la valeur théorique, ce qui correspond à un écart relatif de 9,5 % et montre les limites de précision de l'usinage.

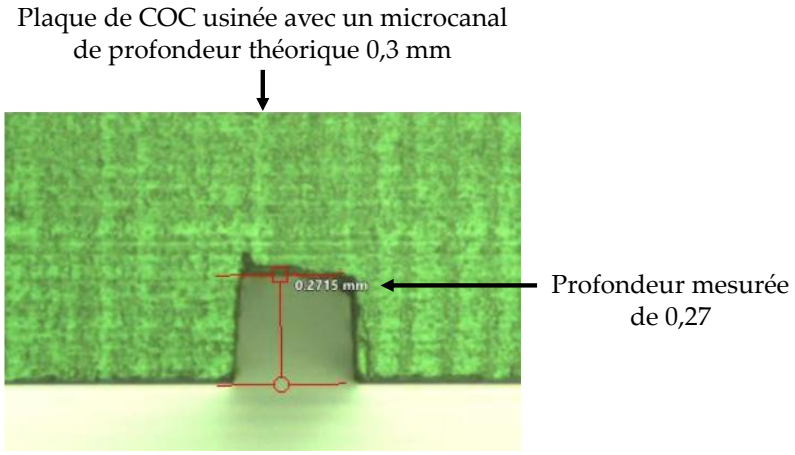


Figure II.15 : Photographie d'une plaque de COC usinée réalisée à partir du profilomètre optique OPP ZIP 250. Le microcanal a une profondeur théorique de 0,3 mm. La valeur réelle mesurée par l'instrument est de 0,2715 mm de profondeur.

Les pièces usinées sont ensuite nettoyées à l'éthanol dans un banc à ultrasons pendant 5 min, puis rincées à l'eau déionisée et séchées. L'assemblage se fait en trois étapes. Les deux parties pneumatiques en COC sont scellées par serrage mécanique à 8 N.m et à 127 °C pendant 1h40 puis la membrane élastique est collée aux couches pneumatique et fluidique après activation par plasma O_2 des surfaces des pièces en COC. Enfin, l'ensemble complet est scellé par serrage mécanique à 15 Nm pendant 90 minutes à température ambiante. L'usinage et l'assemblage des cartouches sont réalisés par l'équipe de microfabrication du laboratoire PRISM du DTIS au CEA Leti.

II.2.2 Banc d'expérimentation microfluidique modulable

Les bancs d'expérimentation du laboratoire servent à contrôler la cartouche microfluidique mais aussi des modules secondaires qui peuvent être ajoutés en fonction des besoins des projets, comme un module thermique, un bras aimanté ou un module optique. Pour ce projet de thèse, le banc microfluidique a été monté par Stéphane Caplet et un module optique a spécialement été développé par Xavier Mermet pour permettre la détection par fluorescence.

i. Interface de commande de la cartouche microfluidique

Le laboratoire du LSMB a développé une instrumentation, appelée « FlowPad », compatible avec les cartouches microfluidiques. Le FlowPad est l'interface de contrôle entre la cartouche microfluidique et les contrôleurs en pression. De chaque côté du FlowPad, il y a 16 connexions pneumatiques de part et d'autre de l'emplacement de la cartouche, permettant au total 32 connexions pneumatiques indépendantes (Figure II.16.A). Pour chacune de ces zones, un joint moulé en silicone composé de 16 trous est positionné afin d'assurer une étanchéité entre le FlowPad et le niveau pneumatique de la cartouche. Une fois la cartouche glissée dans

son emplacement, un système de serrage la bloque à l'intérieur du FlowPad (Figure II.16.B et C).

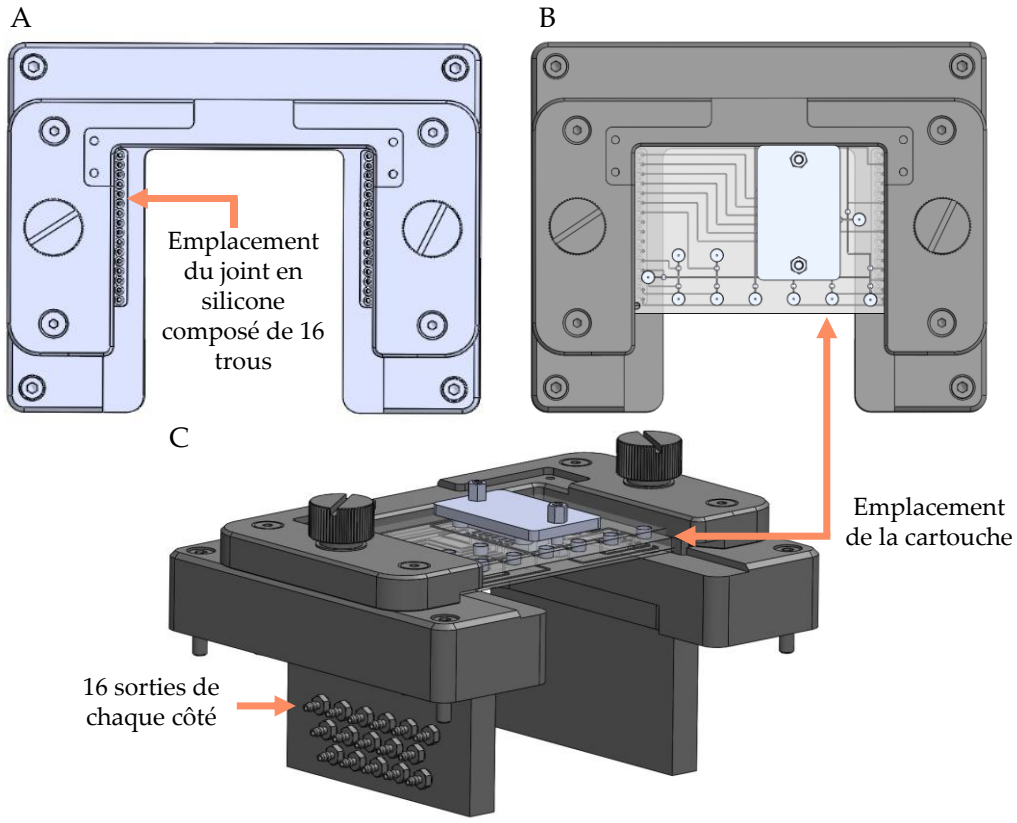


Figure II.16 : Vue schématique du FlowPad avec son porte-carte et ses connexions pneumatiques, (A) Vue de dessus sans la cartouche, (B) Vue de dessus avec la cartouche, (C) Vue en perspective avec la cartouche.

L'actionnement pneumatique des cartouches est possible grâce à l'utilisation de contrôleurs en pression (OEM Pressure Controller, PX Fluigent). Ces contrôleurs sont reliés à 8 blocs de 4 électrovannes, eux-mêmes reliés aux 32 connexions pneumatiques présentes dans la couche « Bottom ». Les électrovannes (SMC, VV061) sont commandables électroniquement et peuvent adresser deux pressions différentes (ici pression positive et négative, Figure II.17).

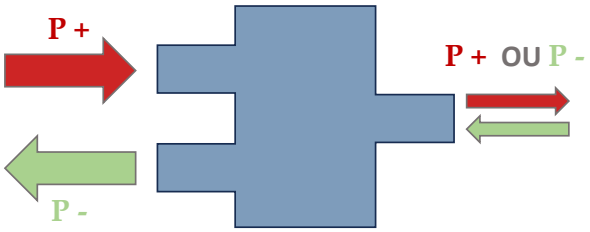


Figure II.17 : Distribution pneumatique d'une électrovanne.

Tous les blocs d'électrovannes sont donc reliés à un contrôleur en pression négative (P_{NEG} = -500 mbar) et à un contrôleur de pression positive (P_V = 600 mbar). Cela permet de contrôler indépendamment 32 micro-vannes dans une cartouche et donne la possibilité de mettre en place des circuits microfluidiques complexes. Un schéma global des connexions pneumatiques du banc fluidique est représenté sur la Figure II.18.

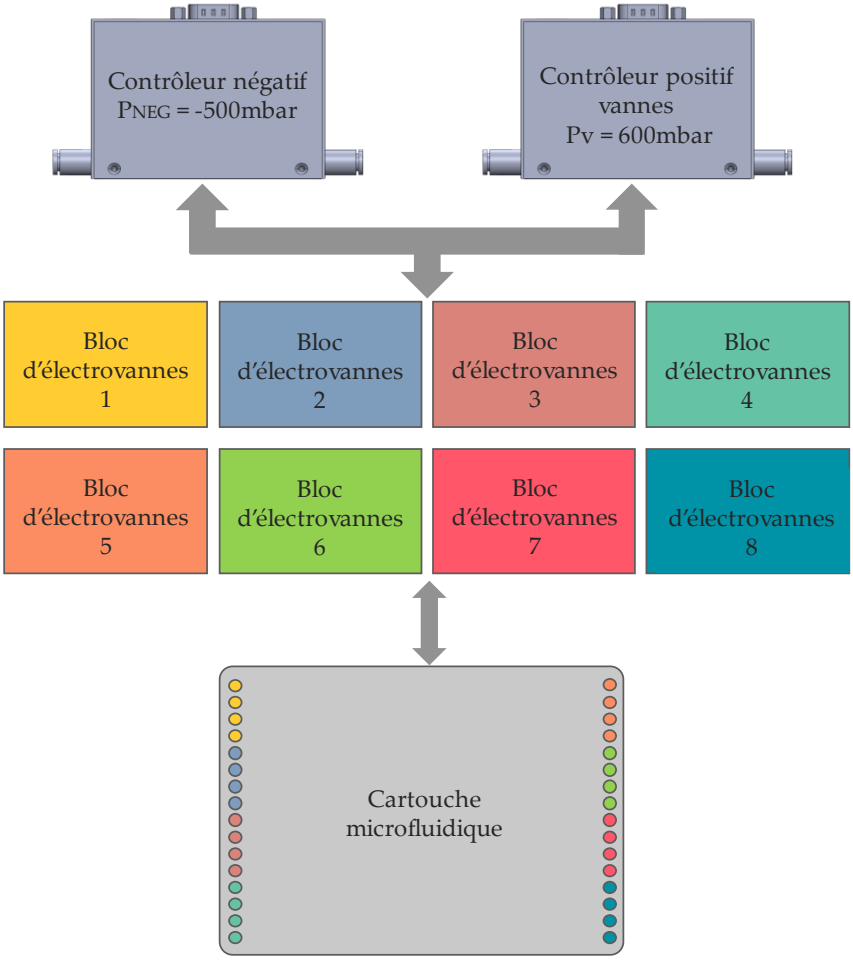


Figure II.18 : Vue schématique des connexions pneumatiques de la plateforme optofluidique, les contrôleurs de pression négatifs et positifs sont reliés aux blocs d'électrovannes.

Sur les précédents bancs d'expérimentation du laboratoire, les parties du contrôle pneumatique et électronique étaient situées en dessous du FlowPad. À présent, pour des raisons de compacité et pour simplifier l'intégration du biocapteur, tous les éléments électroniques ont été déplacés à l'arrière du banc pour laisser la place au module optique sous le FlowPad comme le montre la Figure II.19. L'observation du biocapteur se fera à travers la face inférieure (niveau pneumatique) de la cartouche microfluidique.

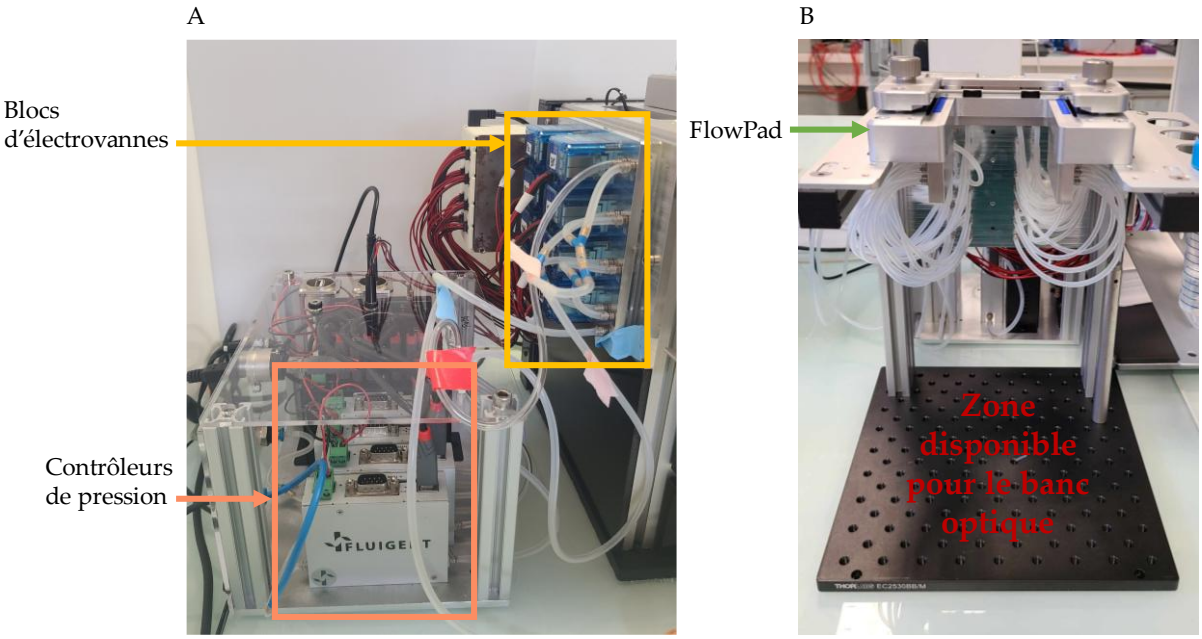


Figure II.19 : A- Photographie de l'arrière de la plateforme avec les parties de contrôle pneumatique, fluidique et électronique, B- Photographie de l'avant de la plateforme, avec la place disponible sous le FlowPad pour le module optique.

ii. Module optique pour la détection de fluorescence

La méthode de transduction choisie étant la fluorescence, il est nécessaire de mettre en place un module optique adapté à cette méthode de détection. Les dimensions du biocapteur sont de 18 x 25,3 mm, mais la zone d'intérêt, composée des canaux de détection, mesure 12,5 x 17,5 mm. C'est pourquoi nous avons décidé de travailler sur une zone intermédiaire de 18 x 21 mm. Le module optique doit respecter le cahier des charges suivant : détecter des plots de fluorescence, de minimum 150 µm de diamètre, sur une zone illuminée de 18 x 21 mm, de manière uniforme pour pouvoir comparer les canaux entre eux. Le fluorophore utilisé est l'AlexaFluor 488 dont les spectres d'excitation et d'émission sont présentés Figure II.20.

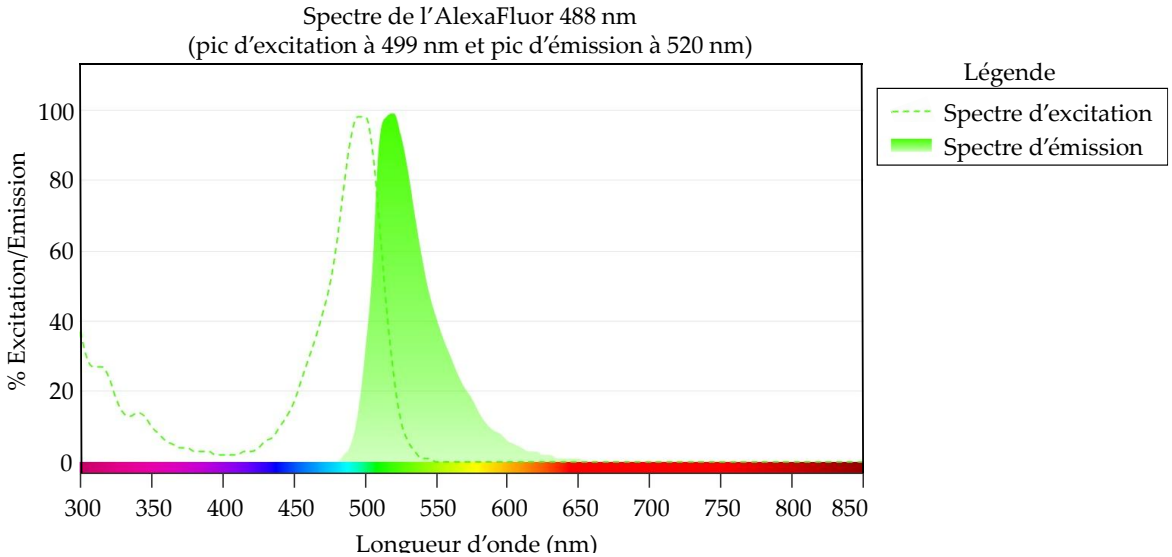


Figure II.20 : Spectre d'excitation et d'émission de l'AlexaFluor 488, [150].

Pour se conformer au cahier des charges, un dispositif d'illumination de type « fly eyes » a été intégré au module d'excitation dans un dispositif de détection en épifluorescence. Le système en épifluorescence reprend le principe de la microscopie à épifluorescence, technique classique utilisée pour l'observation de fluorescence notamment en biologie, composée d'une source d'excitation, d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Le montage « fly eyes » est composé de deux réseaux de microlentilles et d'une autre lentille, comme représenté sur la Figure II.21. Ces matrices de lentilles sont couramment utilisées dans les systèmes d'illumination des vidéoprojecteurs afin de transformer la distribution d'intensité lumineuse issue de la source, de nature non uniforme, en un motif d'illumination uniforme [151]. Le couplage des deux méthodes (épifluorescence + fly eyes) permet donc de collecter des signaux de fluorescence sur une large zone d'illumination homogène.

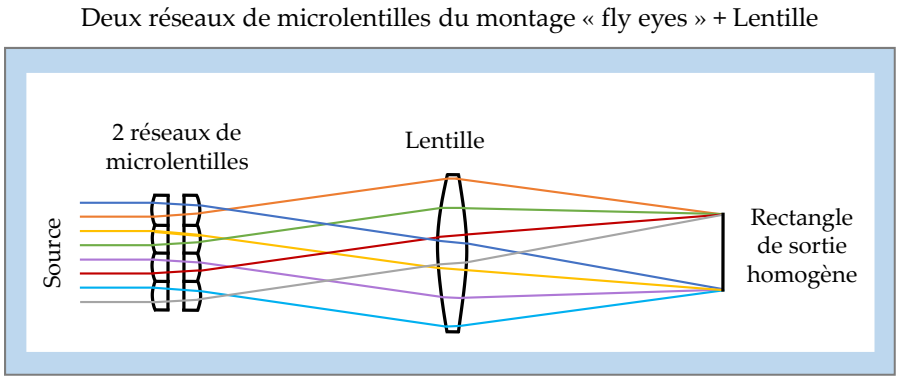


Figure II.21 : Visualisation schématique de deux montages "fly eyes" composés de 2 réseaux de microlentilles et d'une autre lentille pour former un rectangle homogène en sortie. Adapté de Thorlabs [152].

Le module optique complet est représenté sur la Figure II.22. Il est composé d'une source de lumière bleue, choisie pour sa puissance de 6,5 mW au niveau de la cartouche microfluidique, soit une densité surfacique de puissance de 0,086 mW/mm² pour un ampérage de 1000 mA (Figure II.22.1). Cette source est reliée à une fibre optique multimode qui conduit la lumière jusqu'à un collimateur, puis le faisceau traverse un premier filtre laissant passer les longueurs d'onde entre 452 nm et 486 nm (Figure II.22.2 et 3), situées dans la gamme d'excitation de l'AlexaFluor 488. Les deux réseaux de microlentilles du montage « fly eyes » et la lentille associée sont disposés après ce filtre pour obtenir en sortie un rectangle homogène de lumière (Figure II.22.4). Ce rectangle lumineux est ensuite réfléchi sur un miroir dichroïque vers le substrat à analyser (Figure II.22.5 et 6). Les signaux de fluorescence émis après l'excitation du substrat sont transmis à travers le miroir dichroïque puis le filtre d'émission qui laisse passer les longueurs d'onde entre 505 nm et 544 nm et enfin qui passent à travers un objectif permettant de former une image des zones de détection fluorescentes sur la caméra IDS uEye (Figure II.22.7 et 8). Le grossissement de l'objectif est de 0,1 et la caméra IDS uEye a été utilisée en mode 8 bits pour l'acquisition des images avec 256 niveaux de gris. Elle a une résolution de 3088 x 2076 pixels.

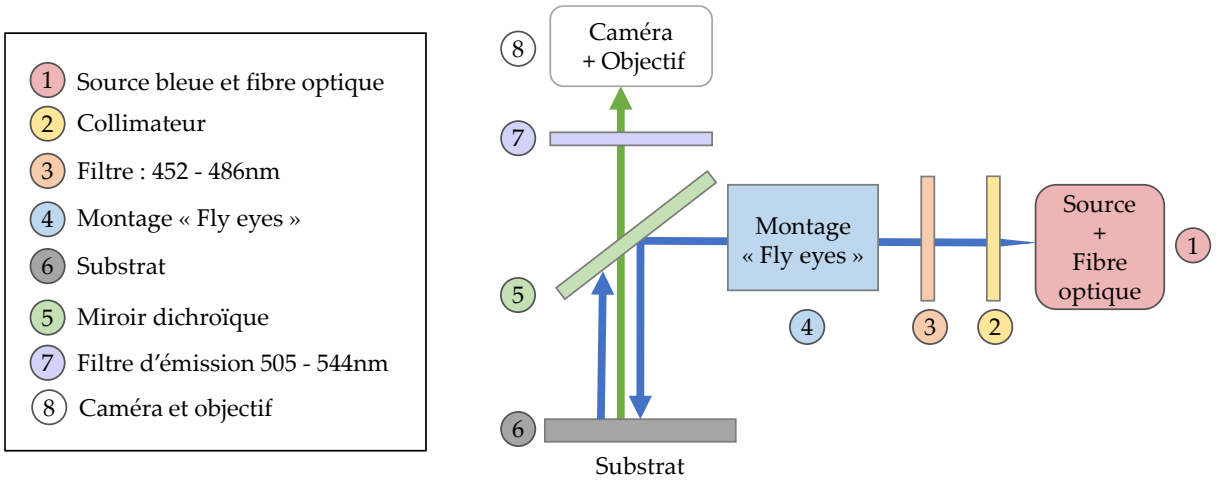


Figure II.22 : Montage optique en épifluorescence et son réseau de microlentilles "Fly eyes ».

Après plusieurs caractérisations qui seront présentées dans le chapitre III, le module optique a été validé et fournit bien une illumination rectangulaire uniforme sur champ large sur une surface de 18 x 21 mm (Figure II.23.A). En moyenne, les plots de fluorescence mesurent 19 pixels pour un diamètre de 250 µm et 10 pixels pour un diamètre de 150 µm, avec un espacement de 6 pixels entre deux plots. Le module optique permet donc de distinguer chaque plot individuellement (Figure II.23.B). Lors des expérimentations, plusieurs paramètres du module sont fixés, notamment la puissance de la LED qui a été réglée à son maximum avec un ampérage de 1000 mA. Le gain du module optique, qui permet l'amplification linéaire du signal mesuré, a été réglé à 100 %. Le dernier paramètre réglable est le temps d'intégration (ou temps d'acquisition) de la caméra, il est le seul à avoir été modifié à plusieurs reprises lors des expérimentations et tout au long du projet pour des raisons détaillées plus loin.

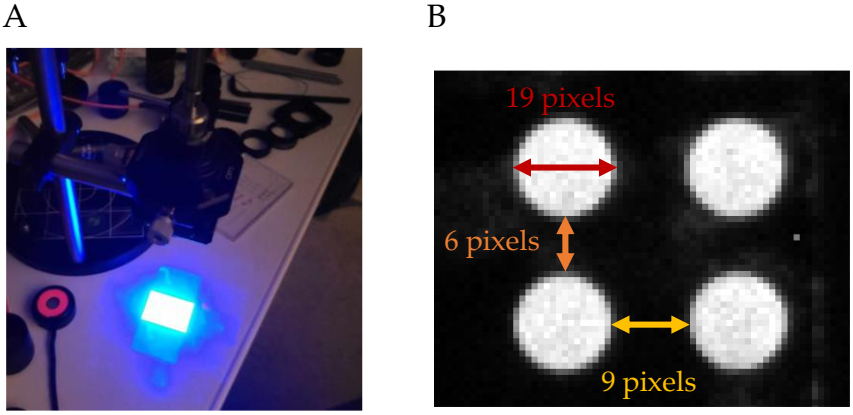


Figure II.23 : A - Illumination rectangulaire uniforme sur champ large du banc optique, B- Résolution spatiale des plots (en pixels).

La plateforme microfluidique est donc composée du banc microfluidique et en dessous de celui-ci se trouve le banc optique. Un capotage de l'ensemble a été réalisé pour éliminer la lumière parasite lors de la détection par fluorescence. Les différents composants du banc sont représentés sur la Figure II.24.

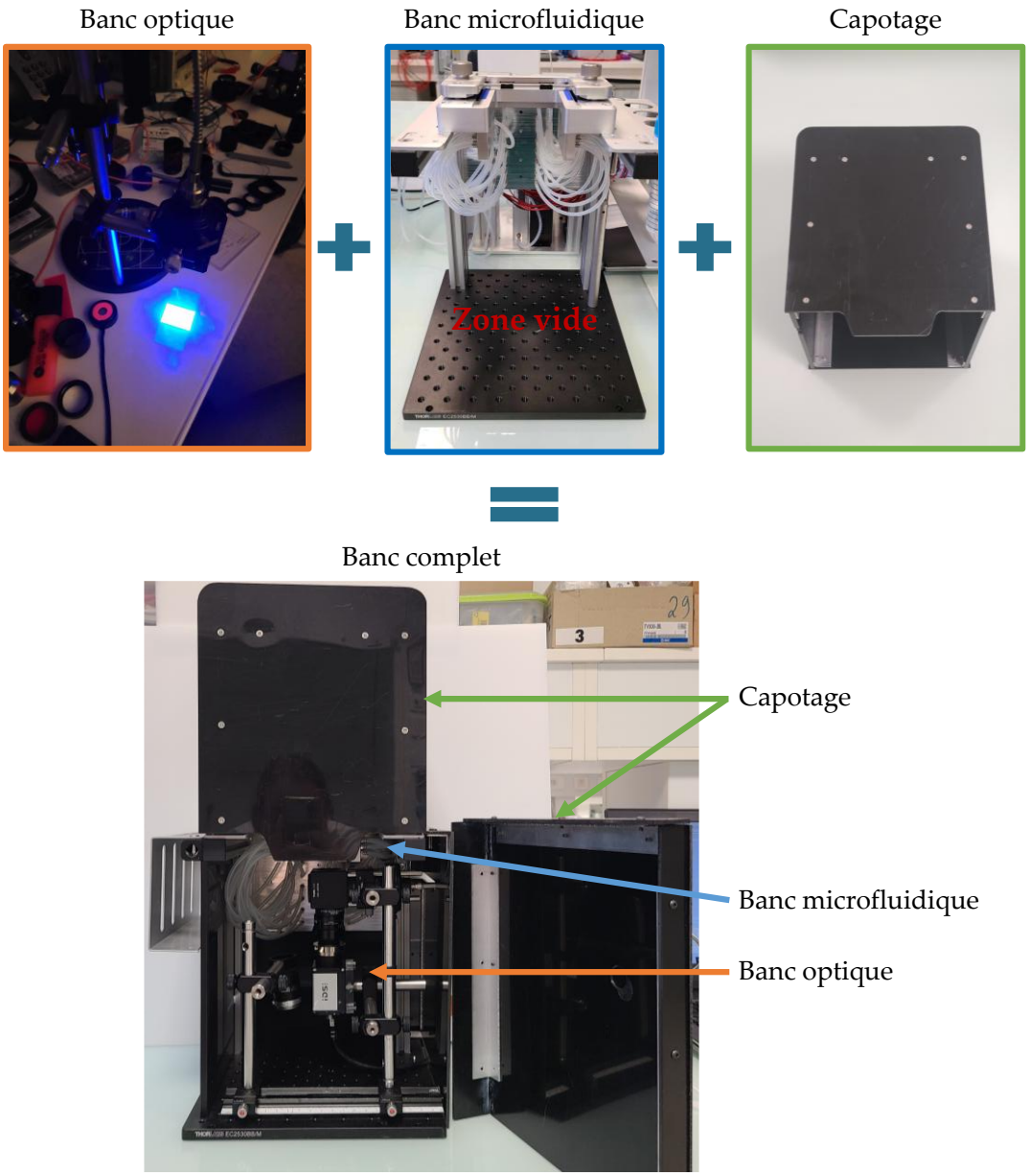


Figure II.24 : Plateforme microfluidique complète avec le module optique sous le banc microfluidique et un capotage complet du dispositif.

iii. Logiciel de contrôle : Uflu

Pour piloter ensemble ou séparément chaque module d'instrumentation sur les bancs d'expérimentation, le logiciel « Uflu Factory » a été développé et programmé en C++ par Jean Porcherot et Lucas Audebert (DTIS/SYMS). Grâce à Uflu Factory, l'utilisateur peut créer une interface comprenant les différents modules de son banc d'expérimentation (Figure II.25). Cela permet de facilement contrôler et paramétrer chaque module.

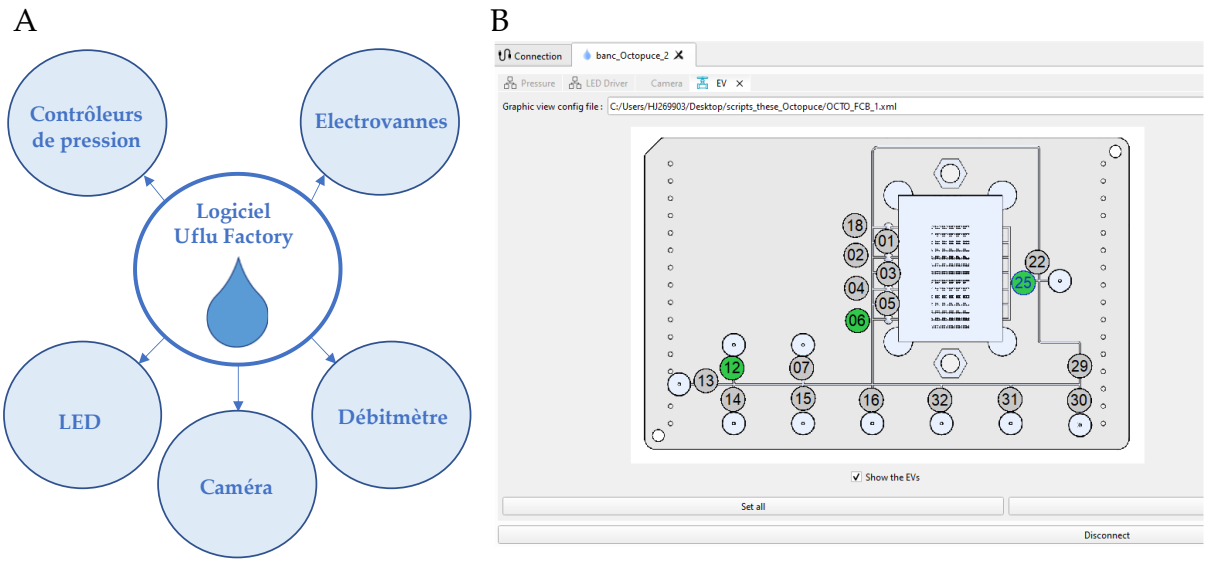


Figure II.25 : Logiciel Uflu, (A) Représentation schématique des modules utilisés pour la gestion des instruments, (B) Capture d'écran de l'interface utilisateur personnalisée.

La plateforme optofluidique de ce projet est donc contrôlée par ce logiciel et est composée des modules suivants :

- Le module « Pressure » qui permet d'activer les contrôleurs de pression et de choisir une consigne en pression pour chacun. Le module permet également de contrôler un débitmètre (Flow Unit, Fluigent).

- Le module « EV » qui permet de piloter les électrovannes reliées aux micro-vannes pneumatiques.

- Le module « LED » qui permet de choisir l'ampérage de la LED et de l'allumer ou de l'éteindre.

- Le module « Caméra », séparé en deux sous-modules. Un sous-module pour le paramétrage de la caméra (ampérage, gain, temps d'intégration…) et un sous-module pour activer le mode appareil photo et le mode vidéo avec une fenêtre de visualisation en direct.

À partir des fenêtres d'interface des modules, l'utilisateur peut récupérer les instructions des commandes. Ces instructions sont codées en langage informatique Python et permettent à l'utilisateur de coder des scripts en Python. L'automatisation de protocoles complexes est ainsi possible grâce au logiciel Uflu Factory.

iv. Plateforme optofluidique complète

La plateforme finale est composée de quatre grandes parties (Figure II.26). La partie fluidique, avec le FlowPad, permet de connecter la cartouche microfluidique à la partie électronique composée des blocs d'électrovannes, des contrôleurs de pression et du système électronique du banc. Ce dernier est également relié à la partie optique et contrôle le banc optique pour la détection de fluorescence. Tous ces éléments sont contrôlables par l'utilisation grâce à la partie logicielle, avec Uflu Factory.

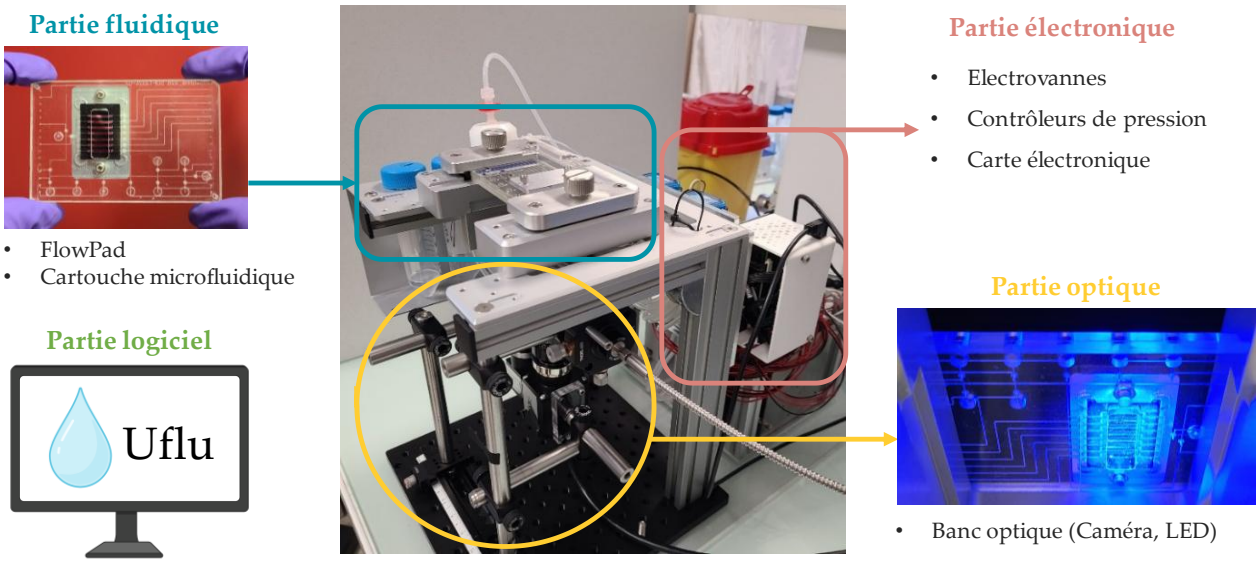


Figure II.26 : Image de la plateforme optofluidique avec toutes ses fonctions.

II.3 Méthodes d'acquisition et de traitement des données

Lors du protocole de biodétection, l'acquisition des images est effectuée après la biocapture des anticorps cibles. Pour garantir l'absence de saturation dans les zones de détection, plusieurs acquisitions sont réalisées pour un canal, en ne modifiant qu'un seul paramètre, le temps d'intégration. Les images obtenues sont ensuite traitées selon un protocole développé au cours de cette thèse.

II.3.1 Méthode d'acquisition des données de fluorescence

Un programme Python a été développé tout au long de la thèse afin de récupérer les données de fluorescence du biocapteur pour ensuite les analyser (Annexe A). Rappelons que chaque biocapteur comporte 7 zones de détection avec 2 x 22 plots distincts chacune. Étant donné que le dépôt des sondes et le positionnement du biocapteur peuvent légèrement varier entre chaque expérimentation, un programme de segmentation a été développé pour appliquer un masque spécifique pour chaque canal. Pour cela, Cellpose, une librairie open source de segmentation d'images biologiques, a été utilisée. Entraîné sur un grand nombre d'images via des réseaux de neurones, Cellpose est un outil puissant capable de segmenter

précisément les images afin d'obtenir un masque et de récupérer les informations souhaitées telles que le centroïde, le diamètre, la position ou encore l'intensité du signal [153].

Le programme Python mis en place est composé de plusieurs étapes :

1. Tout d'abord, les images à analyser sont rognées pour se concentrer sur la zone de détection (Figure II.27).

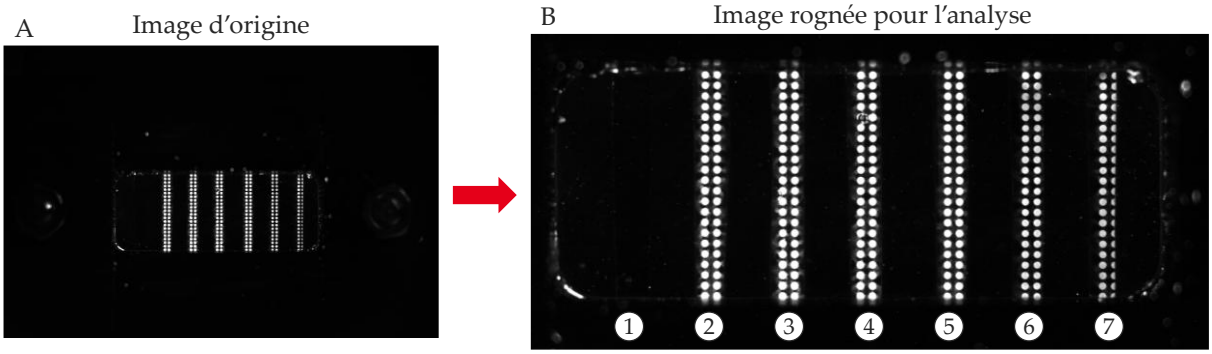


Figure II.27 : A-Image d'origine, B- Image rognée pour étudier plus facilement les plots par la suite. Ici, sur les 7 canaux de détection, le canal n° 1 correspond au contrôle négatif, sans plots fluorescents, les autres canaux sont composés de plots fluorescents après passage de l'échantillon à détecter.

2. Ensuite, l'utilisateur indique combien de colonnes il souhaite analyser.

3. Un curseur de sélection permet à l'utilisateur de sélectionner la zone/le canal à segmenter (Figure II.28).

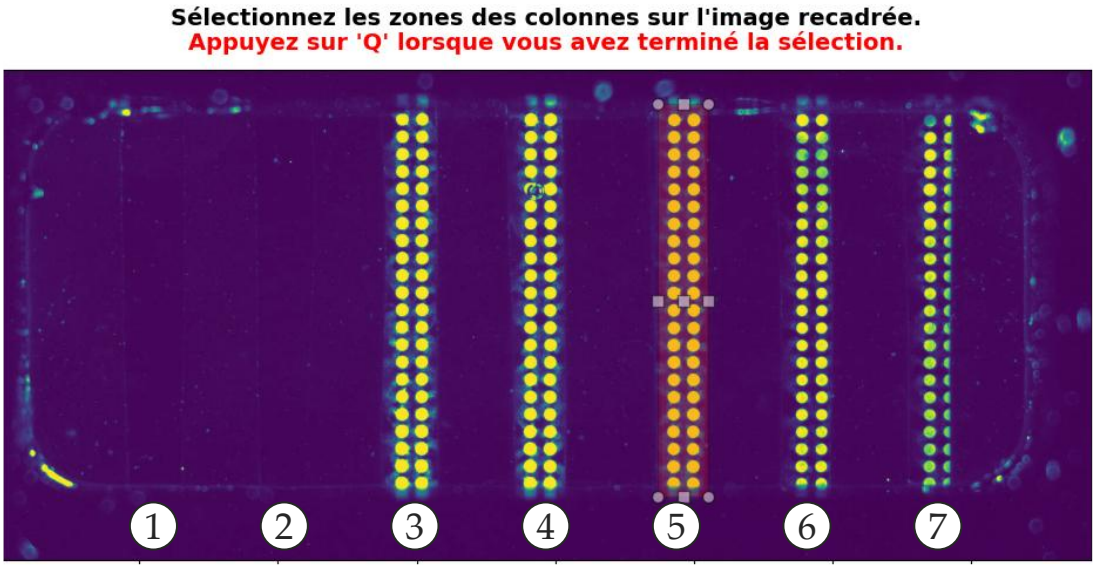


Figure II.28 : Visualisation de l'interface Python permettant de sélectionner la zone à segmenter (ici le canal n° 5 est sélectionné sur une image composée de 2 contrôles négatifs et 5 canaux de détection).

4. La segmentation Cellpose est appliquée dans cette zone sur l'image sélectionnée.

5. Chaque plot identifié est étiqueté avec un numéro.

6. Afin d'éviter les segmentations parasites (poussières, interférences optiques), on récupère le diamètre moyen des plots segmentés et on applique un seuil pour supprimer les segments aberrants. Chaque segment est également réduit de 4 pixels tout autour pour éviter les effets de bord (Figure II.29). Le masque est ensuite appliqué à toutes les autres images sélectionnées, s'il y en a.



Figure II.29 : Exemple de visualisation de la segmentation de la colonne avec un étiquetage pour chaque plot segmenté.

7. On récupère l'intensité moyenne de chaque plot que l'on stocke dans un Excel pour chaque image étudiée (exemple : avant/après capture de la cible fluorescente).

8. Le programme peut se répéter pour une autre colonne à analyser si on le souhaite.

II.3.2 Méthodes de traitement des données de fluorescence

Les signaux de fluorescence bruts ne peuvent pas être interprétés directement, car ils sont susceptibles d'être affectés par des variations dues aux conditions d'acquisition ou aux conditions instrumentales (variation de la source lumineuse, du détecteur ou du temps d'intégration), mais aussi par l'autofluorescence ou le bruit de fond du milieu mesuré. Le traitement des données est donc indispensable pour corriger les différences ne représentant pas de véritables variations biologiques. Les différentes méthodes de prétraitement, de normalisation et de standardisation étudiées sont présentées en Annexes B et C. L'approche mise en place pour analyser les résultats de cette thèse a été adaptée à partir des méthodes reposant sur l'utilisation d'un contrôle interne [154], [155], [156].

i. Prétraitement

Tout d'abord, le bruit de fond local moyen de chaque plot est récupéré. Étant donné que les plots sont très rapprochés, seulement deux zones de bruit de fond sont analysées pour limiter les interférences avec les signaux des plots voisins (Figure II.30).

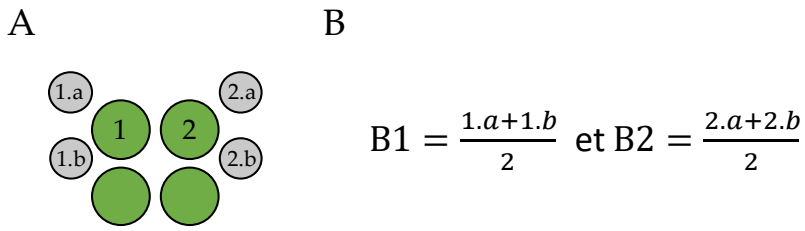


Figure II.30 Illustration de la méthode de récupération du bruit de fond local de chaque plot. A- Pour chaque plot, deux cercles proches sont récupérés comme zones de bruit de fonds, B- Une moyenne est réalisée avec ces deux zones pour chaque plot pour obtenir le bruit de fond local moyen.

Ce bruit de fond moyen est ensuite soustrait aux intensités de fluorescence moyennes brutes, $I_{brute(x,y)}$, de chaque plot de fluorescence :

$$I_{corr(x,y)} = I_{brute(x,y)} - B \quad \text{(II.1)}$$

Pour les études cinétiques, le signal à l'instant t = 0 est également soustrait. Cela peut parfois entraîner des valeurs négatives, qui sont alors ramenées à 0.

ii. Standardisation des résultats à partir d'une zone de référence

L'étape suivante consiste à normaliser toutes les images d'un même essai pour comparer les variations biologiques sans les interférences du système d'acquisition. Pour cela, une zone témoin est sélectionnée sur toutes les images, img_n. Cette zone témoin doit se situer en dehors de la zone de détection et peut correspondre, par exemple, à un résidu de membrane qui autofluoresce ou à une autre partie de la cartouche avec une autofluorescence/lumière parasite stable. Une fois cette zone identifiée, l'intensité moyenne de fluorescence de cette zone est mesurée pour toutes les images, $I_{témoin,img_n}$. Une des images de l'expérimentation est ensuite choisie comme référence, arbitrairement, et l'intensité moyenne de fluorescence de sa zone témoin devient l'intensité de référence, $I_{témoin,réf}$. Un exemple est présenté sur la Figure II.31, avec deux images d'un biocapteur, acquises avec deux temps d'intégration distincts, conduisant à des niveaux d'intensité différents.

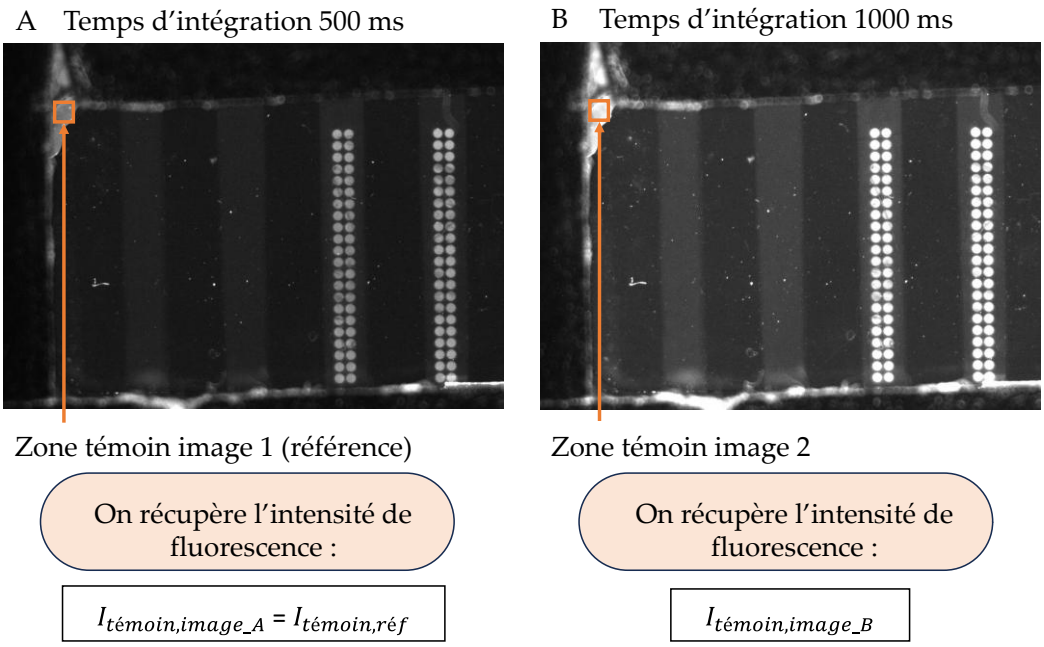


Figure II.31 : Exemple de récupération de la zone témoin (en orange) et sélection d'une image de référence de manière arbitraire, A- image prise comme référence avec en orange la zone témoin dont la moyenne de fluorescence est extraite et sera prise comme référence pour toutes les autres images, B- Deuxième image sur laquelle sera appliquée la normalisation.

L'intensité de fluorescence de la zone témoin de chacune des images est ensuite comparée à celle de la zone témoin de référence, en calculant le rapport $I_{témoin,réf}$ /$I_{témoin,img_n}$ pour chaque image *img_n*. Ce rapport correspond au facteur F_n , qui sera appliqué ensuite sur l'intégralité des pixels de chaque image *img_n*, afin de les ramener à des niveaux d'intensité comparables :

$$F_n = \frac{I_{témoin,réf}}{I_{témoin,img_n}} \tag{II.2}$$

$$I_{norm(x,y)_img_n} = I_{corr(x,y)_img_n} \times F_n \tag{II.3}$$

Si $I_{témoin,img_n}$ est plus intense que $I_{témoin,réf}$ alors le facteur sera inférieur à 1 et diminuera l'intensité globale de l'image. Si $I_{témoin,img_n}$ est moins intense que $I_{témoin,réf}$ alors ce sera l'inverse (Figure II.32).

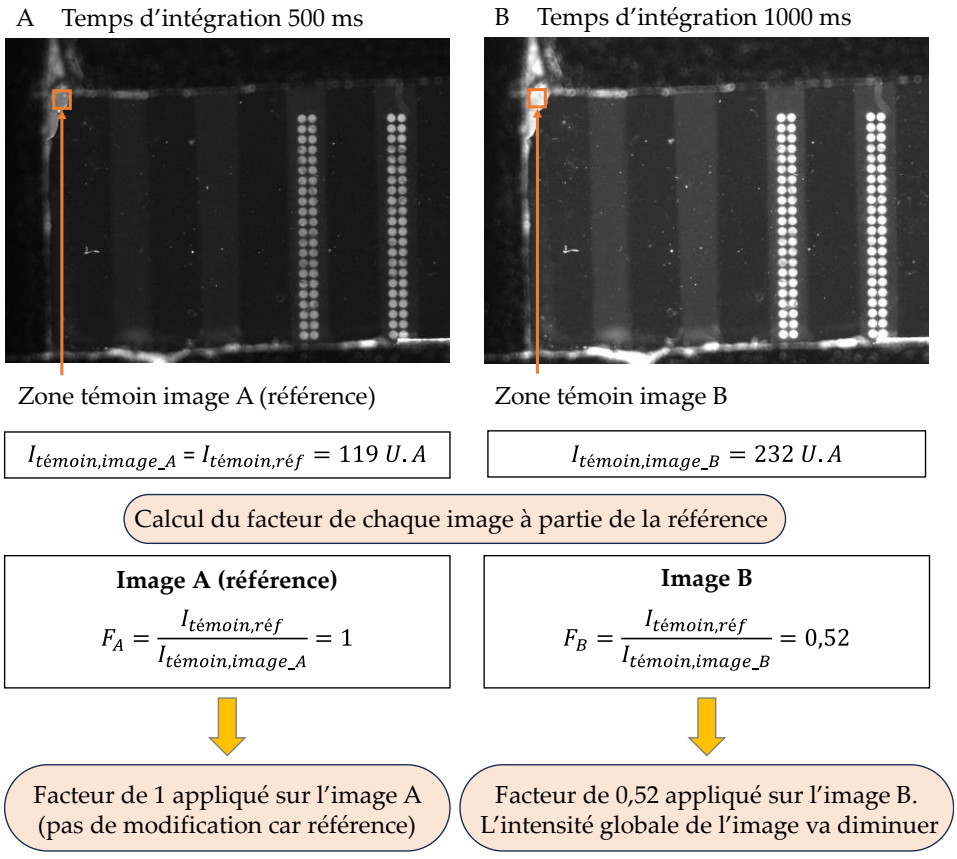


Figure II.32 : Suite de l'exemple : le calcul du facteur est effectué pour les images A et B. L'image A étant l'image de référence, son facteur est égal à 1 et l'intensité de l'image n'est pas modifiée. Le facteur de l'image B est égal à 0,52 car l'intensité de sa zone témoin est plus forte que celle de l'image de référence A. Une fois le facteur appliqué, l'intensité globale de l'image B diminue et l'intensité de sa zone témoin sera égale à celle de la zone de référence de l'image A.

Pour montrer l'effet de cette correction, un exemple concret est présenté ci-dessous :

La méthode est utilisée sur l'un des canaux de détection d'une expérimentation. Plusieurs séries d'images ont été prises sur ce canal en faisant varier les paramètres d'acquisition : d'une part, des acquisitions manuelles réalisées avec le logiciel Uflu à différents temps d'intégration, et d'autre part, des acquisitions automatisées effectuées via un script Python contrôlant Uflu avec un temps d'intégration fixe de 1000 ms. Les données brutes de l'intensité moyenne pour chaque plot du canal sont présentées sur la Figure II.33 sous forme de boîtes à moustaches (boxplot), dont le principe est expliqué en Annexe D. On peut voir d'un côté l'intensité de fluorescence augmenter avec le temps d'intégration pour les images acquises manuellement et de l'autre que les images acquises dans les mêmes conditions automatiquement présentent une forte variation de fluorescence entre elles alors qu'elles devraient être similaires. De plus, l'image manuelle à 1000 ms de temps d'intégration est également beaucoup plus intense que les images prises automatiquement avec ce temps d'intégration.

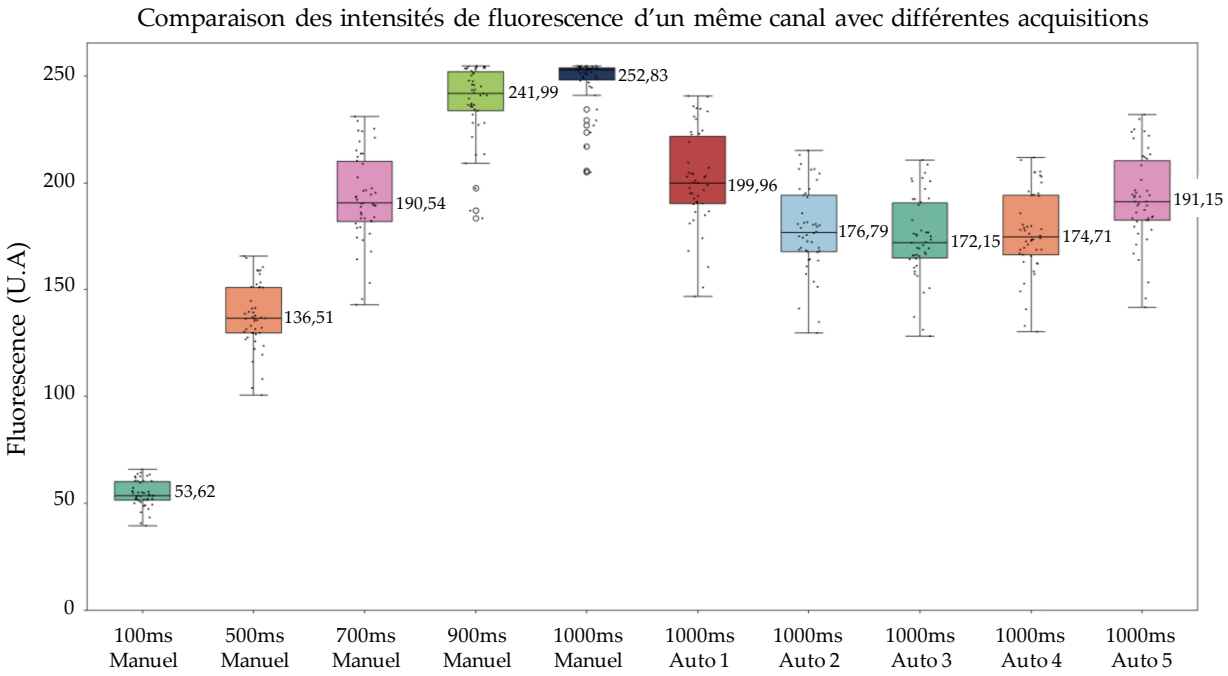


Figure II.33 : Visualisation des données brutes comparant les intensités de fluorescence de plusieurs images représentant le même canal avec différents paramètres d'acquisition : prise d'image manuelle ou automatique avec le logiciel Uflu et à plusieurs temps d'intégration. Chaque boxplot représente la moyenne de fluorescence de chaque plot contenu dans le canal de détection.

La première étape qui soustrait le bruit de fond local entraine une baisse de l'intensité de fluorescence de chaque image, comme le montre la Figure II.34. Cependant cela ne permet pas de compenser les différences d'acquisitions et les erreurs de l'instrument : les images prises automatiquement à la suite avec les mêmes paramètres ont toujours des résultats de fluorescence différents et la variation du temps d'intégration n'est pas compensée.

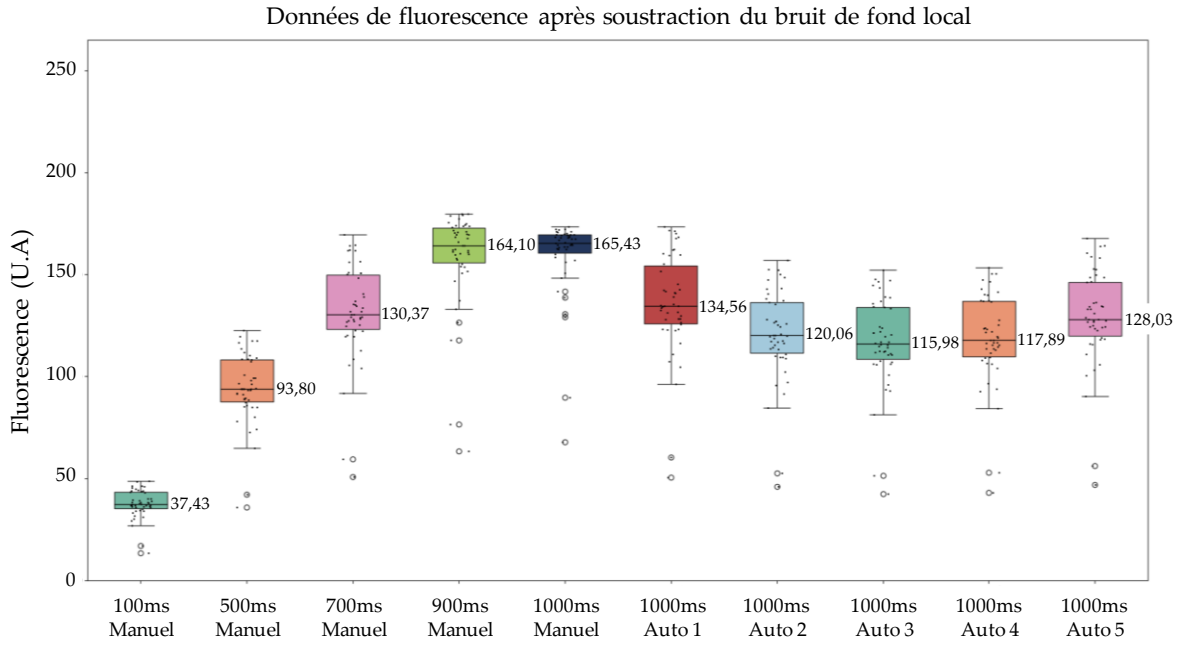


Figure II.34 : Visualisation des données de fluorescence après soustraction du bruit de fond local pour chaque plot.

La normalisation est ensuite effectuée en prenant la zone témoin de l'image « 1000 Auto2 » comme référence $I_{témoin,réf}$, de manière arbitraire. Le facteur associé à chaque image est calculé et appliqué aux résultats. La Figure II.35 représente les données une fois normalisées. On remarque que toutes les valeurs d'intensité, recalées par rapport à l'image de référence, sont à présent beaucoup moins dispersées entre elles. La méthode a permis de supprimer l'influence du temps d'intégration et des variations du système tout en conservant une lecture claire des résultats.

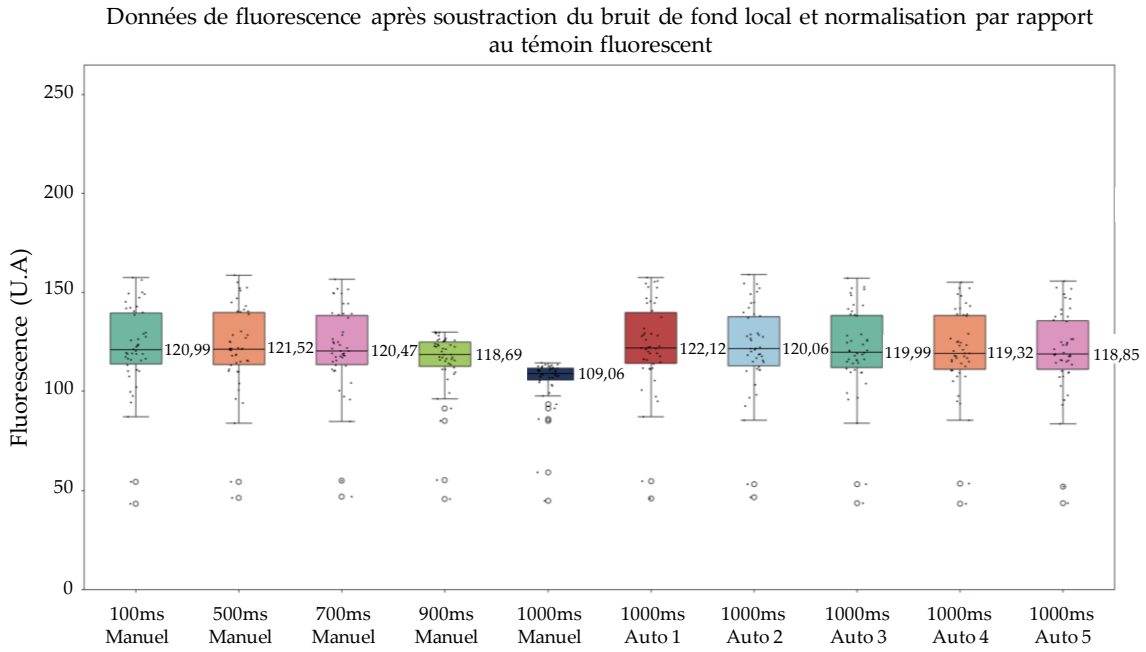


Figure II.35 : Visualisation des données après soustraction du bruit de fond puis application de la méthode de normalisation pour chaque plot.

Sur les graphiques précédents, certains plots de fluorescence présentent des valeurs d'intensité anormalement faibles ou élevées. Considérées comme des valeurs aberrantes, elles sont entourées d'un cercle noir. On suppose que ces valeurs aberrantes résultent de variations d'intensité parasites observées aux extrémités des canaux. Pour limiter l'influence de ces valeurs, les quatre plots situés aux deux extrémités du canal ont été exclus de l'analyse, soit 8 plots sur 44. Cette exclusion réduit la présence de certains points aberrants. Sur la Figure II.36, les valeurs aberrantes minimales de la Figure II.35 ont été retirées, ce qui signifie qu'elles correspondaient bien aux plots présents aux extrémités du canal.

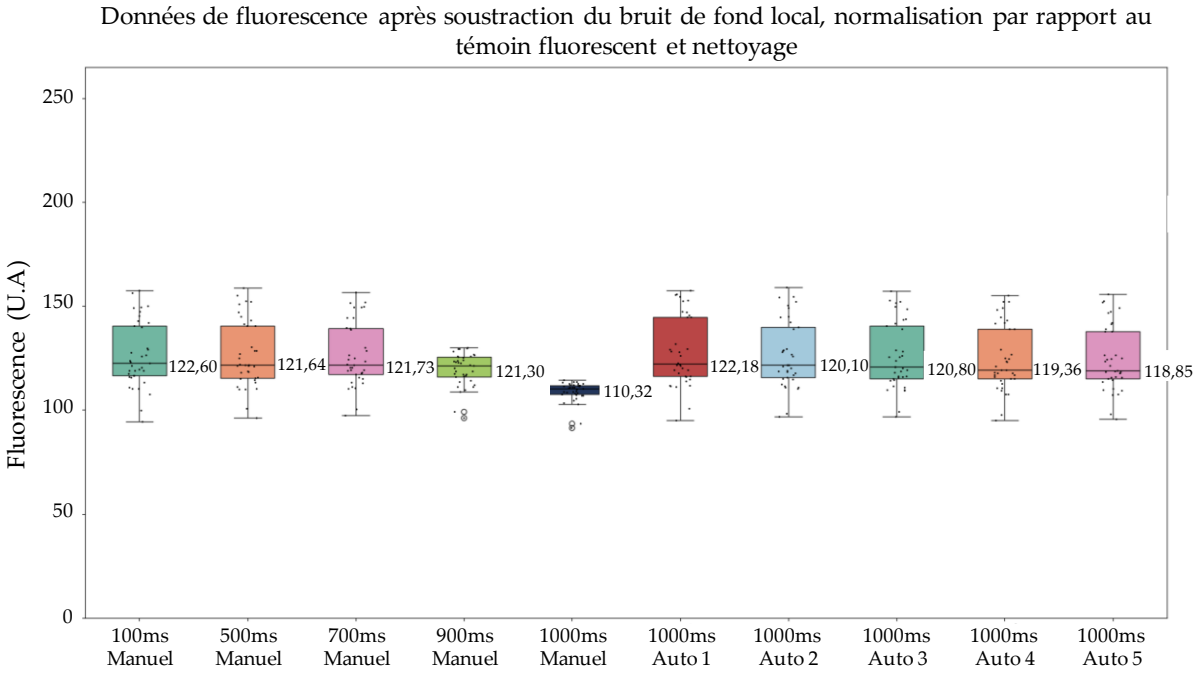


Figure II.36 : Visualisation des données normalisées après normalisation et en supprimant les plots aux extrémités du canal.

Cette méthode de normalisation a été appliquée à tous les résultats présentés dans les chapitres IV et V.

Résumé du Chapitre II

- Le biocapteur choisi pour cette thèse est composé d'un substrat de silicium fonctionnalisé avec des anticorps comme biorécepteurs, immobilisés de façon covalente sur une couche de silane.

- La fluorescence est la méthode de détection sélectionnée pour mettre au point les protocoles de biodétection. Cela permet de travailler avec un biocapteur simplifié pour développer la plateforme optofluidique.

- Un couple modèle d'anticorps a été choisi comme biorécepteurs (Anticorps Lapin) et comme cibles d'intérêt (Anticorps anti-Lapin AF488) pour mettre au point et valider les différentes étapes de conception du biocapteur et de la plateforme optofluidique.

- Les deux protocoles de silanisation du substrat de silicium utilisés pour l'immobilisation des anticorps ont été décrits : un protocole de silanisation en phase gaz couramment utilisé au CEA Leti, et un protocole de silanisation en phase liquide développé à l'INL et couplé à la chimie click pour immobiliser les anticorps de façon orientée.

- La plateforme optofluidique a été présentée et adaptée au sujet de thèse pour permettre une détection de fluorescence sur champ large conformément au cahier des charges.

- La méthode d'acquisition des données de fluorescence a été présentée avec le programme Python de segmentation d'image à partir de la librairie Cellpose.

- La méthode de traitement des données retenue repose sur l'utilisation d'une zone témoin, dont la fluorescence reste stable au cours du temps, comme référence. À partir des informations de cette zone, toutes les images sont normalisées à l'aide d'un facteur individuel. Cette approche permet d'éliminer l'influence des variations intrinsèques du système, notamment celles liées au temps d'intégration.

Chapitre III

Développement et caractérisation d'un système optofluidique intégrant un biocapteur

Introduction

Le chapitre III se concentre sur l'élaboration de la cartouche microfluidique, en présentant la méthode d'intégration du biocapteur et les architectures microfluidiques. Des caractérisations fluidiques et optiques sont ensuite détaillées afin de valider l'étanchéité du système, le fonctionnement des actionnements fluidiques, l'uniformité et la stabilité du banc optique ainsi que la compatibilité de la cartouche avec la détection par fluorescence.

III.1 Élaboration d'une cartouche microfluidique réutilisable intégrant un biocapteur de fluorescence

Dans le domaine biomédical, les dispositifs en contact avec des échantillons biologiques sont souvent à usage unique. Cette approche vise à prévenir les contaminations croisées, à garantir la fiabilité des analyses et à réduire les risques biologiques pour l'utilisateur et le patient. Cette approche, issue des exigences de sécurité sanitaire, a longtemps influencé la conception des systèmes microfluidiques jetables. Cependant aujourd'hui, ce modèle est remis en question face aux enjeux environnementaux. En effet, selon Ongaro et *al*., les laboratoires biomédicaux génèrent chaque année plusieurs tonnes de déchets plastiques non recyclables issus des microdispositifs de diagnostic, soulevant des inquiétudes quant à l'empreinte environnementale des plateformes analytiques à usage unique [157]. Dans le même sens, Kostapanou et *al.* soulignent que la durabilité devient un impératif stratégique dans la conception des dispositifs médicaux et analytiques [158]. Les auteurs mentionnent notamment l'approche européenne du Safe and Sustainable-by-Design (SSbD) qui intègre les considérations de sécurité, de durabilité et de circularité dès les premières étapes de la conception des produits et des procédés, afin de minimiser les risques pour la santé humaine et l'environnement tout au long du cycle de vie [159]. Cette démarche s'inscrit dans la continuité du principe des « 3 R » (Reduce, Reuse, Recycle) imaginé à l'origine par l'Environmental Protection Agency (EPA) au début des années 1990. Ce principe, pilier de la gestion des déchets, encourage à réduire la production de déchets à la source, à réutiliser les composants quand cela est possible, et à recycler les matériaux en fin de vie. Ces notions sont aujourd'hui reprises et intégrées dans de nombreux domaines, notamment dans la recherche. Face à ces problématiques, la question de la réutilisation des dispositifs microfluidiques est donc de plus en plus étudiée. Ces dispositifs étant en contact direct avec des fluides biologiques, leur réutilisation soulève des défis et reste donc un enjeu important pour la réduction des déchets mais également pour la réduction des coûts.

Cette première partie du chapitre est donc consacrée à la conception et à la validation de la cartouche microfluidique en présentant la méthode d'intégration modulaire amovible du biocapteur dans la cartouche, ainsi que les techniques d'actionnement fluidique associées. Le développement complet de la cartouche, incluant son architecture finale et les validations fluidiques réalisées, y est également détaillé.

III.1.1 Développement d'une solution modulaire

i. Assemblage pour l'intégration modulaire du biocapteur

Dans le cadre de cette thèse, les biocapteurs sont considérés comme à usage unique en raison de l'accroche biologique cible/sonde. Bien que cette interaction soit réversible, la régénération des biocapteurs n'a pas été étudiée dans ce projet. Dans cette configuration, si les biocapteurs étaient scellés directement dans la cartouche microfluidique, celle-ci ne pourrait être utilisée qu'une seule fois. Or une cartouche microfluidique en COC nécessite entre 4 h et 8 h d'usinage et d'assemblage. C'est pourquoi une intégration amovible de type « plug and play » a été envisagée pour un montage et démontage simple du dispositif final tout en conservant la cartouche microfluidique. Cette approche a permis de réduire les déchets

produits au cours des trois années de thèse, et s'inscrit dans la logique du SSbD promue à l'échelle européenne.

Le cahier des charges pour cet assemblage modulaire est le suivant :

- L'assemblage doit être réutilisable et simple à monter.
- L'intégration modulaire ne doit pas détériorer la fonctionnalisation de surface du biocapteur.
- Le système doit être totalement étanche même après plusieurs heures d'utilisation.
- Les canaux doivent être parallèles, non déformés et doivent être simples à aligner sur le biocapteur.
- L'assemblage doit être compatible avec une analyse par fluorescence.

Sur la Figure III.1A, une conception assistée par ordinateur (CAO) représente l'empilement qui a été imaginé pour valider ce cahier des charges. Une intégration modulaire est possible grâce à l'utilisation d'un joint structuré composé de plusieurs canaux. Ce joint est inséré dans un emplacement dédié dans la cartouche microfluidique. Le biocapteur est ensuite déposé avec sa face de détection vers le joint (Figure III.1-B). Une contre-bride est ensuite vissée par-dessus le capteur, ce qui plaque le capteur contre le joint et la cartouche. Cet assemblage immobilise le biocapteur dans la cartouche avec une mise en place simple. L'utilisation d'un joint structuré, sur lequel est déposé le biocapteur, permet de ne pas détériorer la fonctionnalisation de surface dans la zone de détection. Pour s'assurer du respect des critères établis plus haut, cette intégration modulaire va être évaluée dans les parties suivantes.

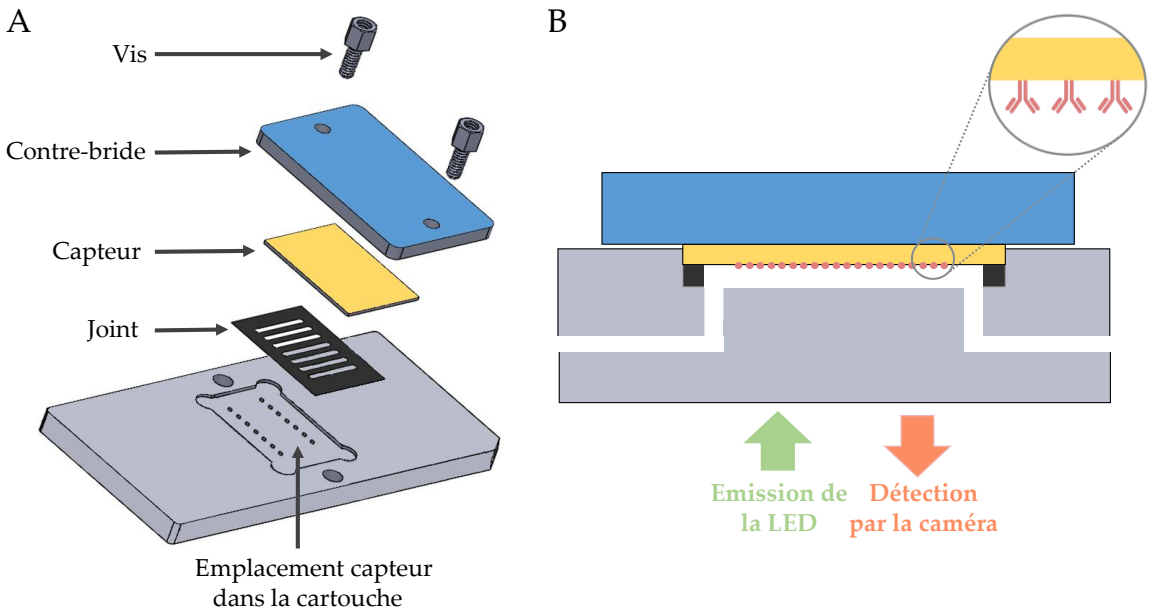


Figure III.1: A- CAO de l'empilement permettant l'intégration modulaire du biocapteur, B- Vue en coupe de l'empilement pour une détection de la fluorescence sous la cartouche microfluidique. Cette zone de biodétection est face au joint.

ii. Validation de l'assemblage modulaire

Dans un premier temps, pour tester l'étanchéité de cet assemblage ainsi que sa réutilisabilité, une cartouche microfluidique simple, sans vanne pneumatique intégrée, a été fabriquée (Figure III.2). Cette cartouche est donc seulement composée d'un niveau fluidique en COC assemblé avec une autre plaque de COC, non usinée, pour sceller les canaux fluidiques. Aucune membrane élastique n'est utilisée. Il y a un total de 14 canaux indépendants, au sein de la cartouche, chacun relié à une entrée et une sortie.

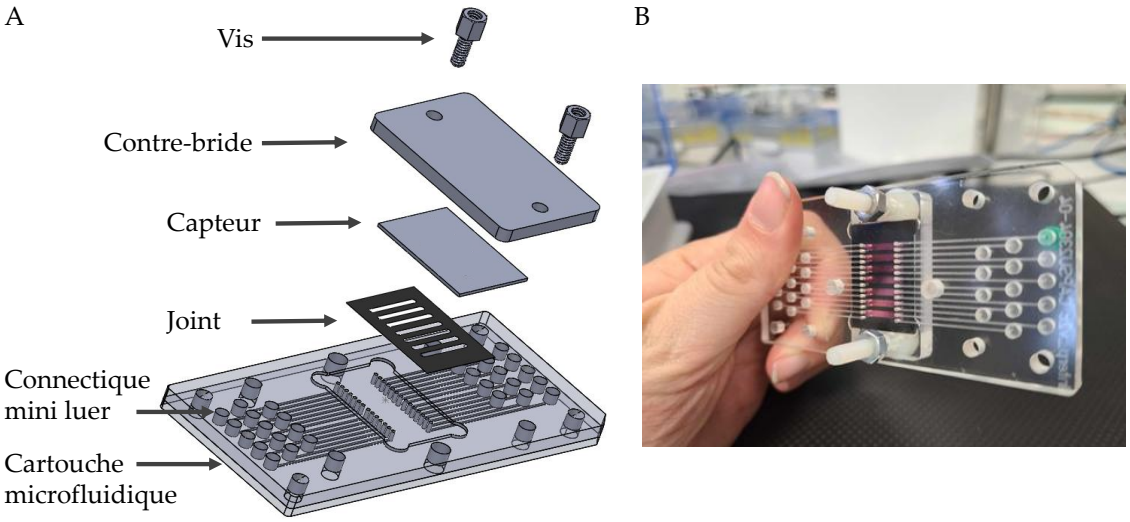


Figure III.2 : Cartouche microfluidique intégrant le biocapteur, A- Vue éclatée de l'empilement, B- Cartouche microfluidique complète.

Pour obtenir un assemblage totalement étanche, des tests ont donc été effectués à partir de cet empilement joint/capteur/contre-bride en jouant sur les matériaux, l'épaisseur ainsi que la forme du joint et de la contre-bride. Avec ce type de cartouche microfluidique, un pousse-seringue (AMF LSPone, Suisse) est utilisé pour injecter et contrôler les fluides dans la cartouche. Une représentation schématique ainsi qu'une photographie du système complet sont présentées sur la Figure III.3.

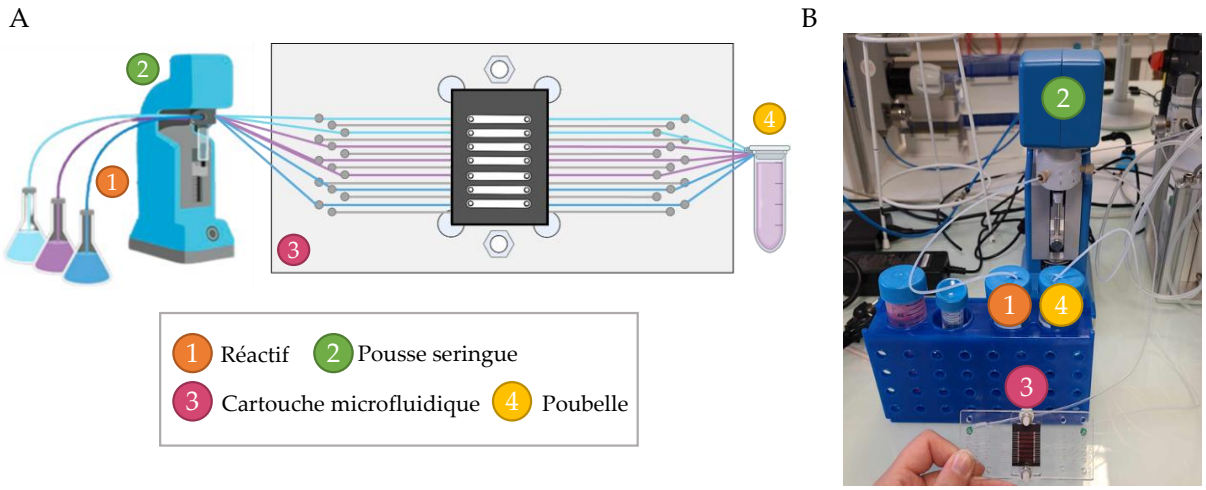


Figure III.3 : A- Photographie du système simplifié avec l'utilisation d'un pousse-seringue (AMF LSPone) pour le contrôle et l'injection des réactifs, B- Vue schématique du système.

Plusieurs approches ont été évaluées pour réaliser un assemblage conforme au cahier des charges. Le Tableau III-1 récapitule les différents types de joints étudiés selon les critères suivants : l'étanchéité du système, l'alignement et la non-déformation des canaux et la réutilisabilité de la cartouche.

Type de joint	Etanchéité	Canaux non déformés et parallèles	Réutilisation
Feuille d'EPDM de 0,6 mm	✗	✓	✓
Feuille de silicone de 0,6 mm	✗	✓	✓
Ecoflex 0,2 mm	✓	✗	✗
Silicone moulé de 0,4 mm	✓	✗	✓
Silicone moulé de 0,6 mm	✓	✓	✓

Tableau III-1 : Récapitulatif des différents types de joints testés et leur compatibilité avec le cahier des charges.

Dans un premier temps, des feuilles d'Ethylène-Propylène-Diène Monomère (EPDM) de 600 µm ont été utilisées pour permettre un prototypage rapide par découpe laser. Cette solution a été déclinée en variant plusieurs paramètres de l'assemblage, tels que l'épaisseur et le matériau de la contre-bride (PMMA puis aluminium), le nombre de vis (2 ou 4) et le nombre de canaux (7 ou 14). Malgré ces modifications, des fuites systématiques ont été observées lors de l'injection de liquide dans les canaux (Annexe E). Des feuilles de silicone de 0,6 mm d'épaisseur ont également été découpées au laser, mais ont donné les mêmes résultats que pour les feuilles d'EPDM. Ces fuites pourraient être liées à la rigidité des feuilles d'EPDM et de silicone et à leur faible pouvoir adhérant. Des matériaux plus souples ont donc été évalués. Notamment l'Ecoflex (Smooth On, US), une membrane hyperflexible de 0,2 mm qui a été découpée à l'aide d'un traceur de découpe (Mimaki CFX, Japon). Ce matériau a permis de rendre le système complètement étanche. Cependant, la découpe de ce matériau est laborieuse et empêche de valider le critère de canaux non déformés et parallèles (Annexe E).

Enfin, des joints en silicone (MED6010), conçus à partir d'un moule en PMMA et composés de 7 canaux, ont été fabriqués. Deux épaisseurs (0,4 mm et 0,6 mm) ont été évaluées, assurant toutes les deux l'étanchéité du système (Figure III.4.A). Le joint de 0,4 mm s'est toutefois avéré trop flexible et difficile à manipuler. Le choix s'est donc porté sur celui de 0,6 mm, plus rigide et plus simple à positionner et validant tous les critères du cahier des charges (Figure III.4.B). La configuration retenue n'a permis d'exploiter que 7 canaux sur les 14 initialement prévus, du fait d'un espacement insuffisant entre les canaux du joint en silicone et de l'incompatibilité de ces dimensions avec l'intégration de vannes pneumatiques.

L'assemblage final comporte donc un joint structuré de 7 canaux en silicone moulé ainsi qu'une contre-bride en aluminium avec deux vis pour conserver une intégration compacte et une bonne visibilité dans la cartouche. Une étude en pression a également démontré que cet assemblage résiste à une pression de 1 bar pendant 10 minutes, sans fuite, validant son étanchéité et sa robustesse (Annexe F). Pour réutiliser la cartouche, un nettoyage à l'éthanol puis à l'eau déionisée sont effectués après chaque protocole de biodétection réalisé.

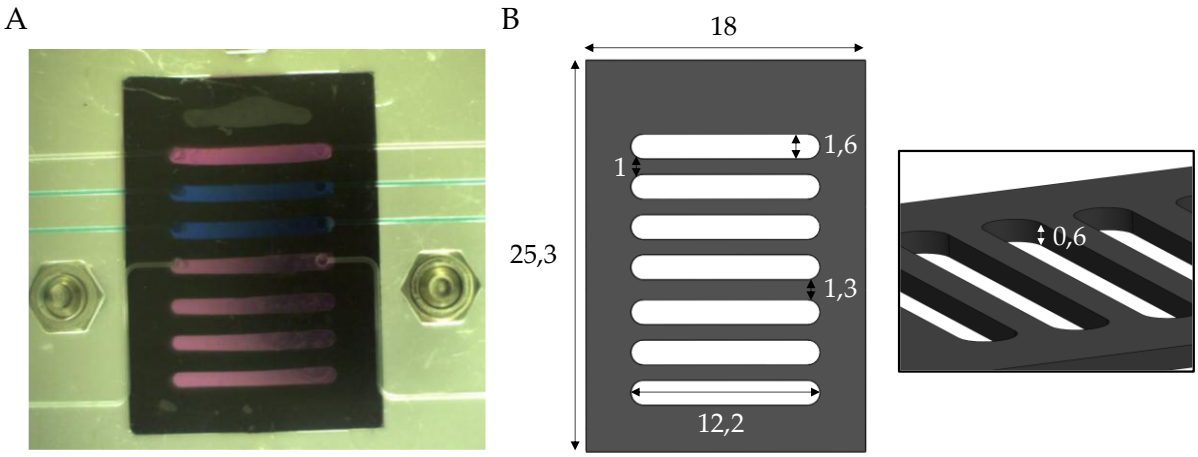


Figure III.4 : A - Visualisation de l'injection d'un colorant bleu dans la cartouche microfluidique, montrant l'étanchéité du système avec le joint en silicone moulé (MED6010), les canaux en rose ne sont pas remplis, la couleur provenant du substrat B- Dimensions (en mm) finales du joint de 0,6 mm d'épaisseur avec des canaux de 12,2 mm de longueur et 1,6 mm de largeur.

III.1.2 Choix de l'actionnement fluidique

La cartouche microfluidique simplifiée a permis de valider l'intégration modulaire du biocapteur, cependant elle a aussi démontré ses limites. En effet, l'architecture de la cartouche et l'utilisation d'un pousse-seringue ne sont pas adaptées pour le développement de protocoles fluidiques complexes. Il faudrait réaliser de nombreux et longs lavages entre chaque injection de réactifs et avoir une grande quantité de réactifs pour compenser les volumes morts présents dans les tubes. Pour dépasser ces limitations, une solution envisagée est l'intégration de micro-vannes pneumatiques dans l'architecture microfluidique basée sur la technologie pneumatique décrite dans le chapitre II.

Plusieurs méthodes d'actionnements fluidiques sont possibles avec cette technologie, évitant le recours à des instruments externes comme un pousse-seringue ou une pompe péristaltique qui sont en contact direct avec les liquides et nécessitent l'utilisation de plusieurs tubulures. Parmi les méthodes compatibles, on retrouve l'actionnement fluidique par volume contrôlé et l'actionnement fluidique en flux continu. Ces deux méthodes ont été étudiées dans cette thèse.

i. Microfluidique digitale FlowStretch

La microfluidique digitale FlowStretch est une technologie discrète de contrôle fluidique possible via l'actionnement de la membrane pneumatique permettant le contrôle de vannes pneumatiques mais également de chambres fluidiques. Avec cette méthode de contrôle en volume, le liquide présent dans la cartouche peut se déplacer de chambres en chambres, reliées entre elles par des canaux fluidiques. Les vannes isolent les chambres les unes des autres et permettent de diriger le fluide dans la cartouche. Pour cela, la pression appliquée au niveau des vannes doit être supérieure à celle appliquée au niveau des chambres. Les pressions utilisées pour les vannes sont donc de 600 mbar contre 350 mbar pour les chambres. Ces valeurs sont issues d'études antérieures au projet de thèse, réalisées au LSMB.

Une vue schématisée de l'actionnement est présentée sur la Figure III.5.

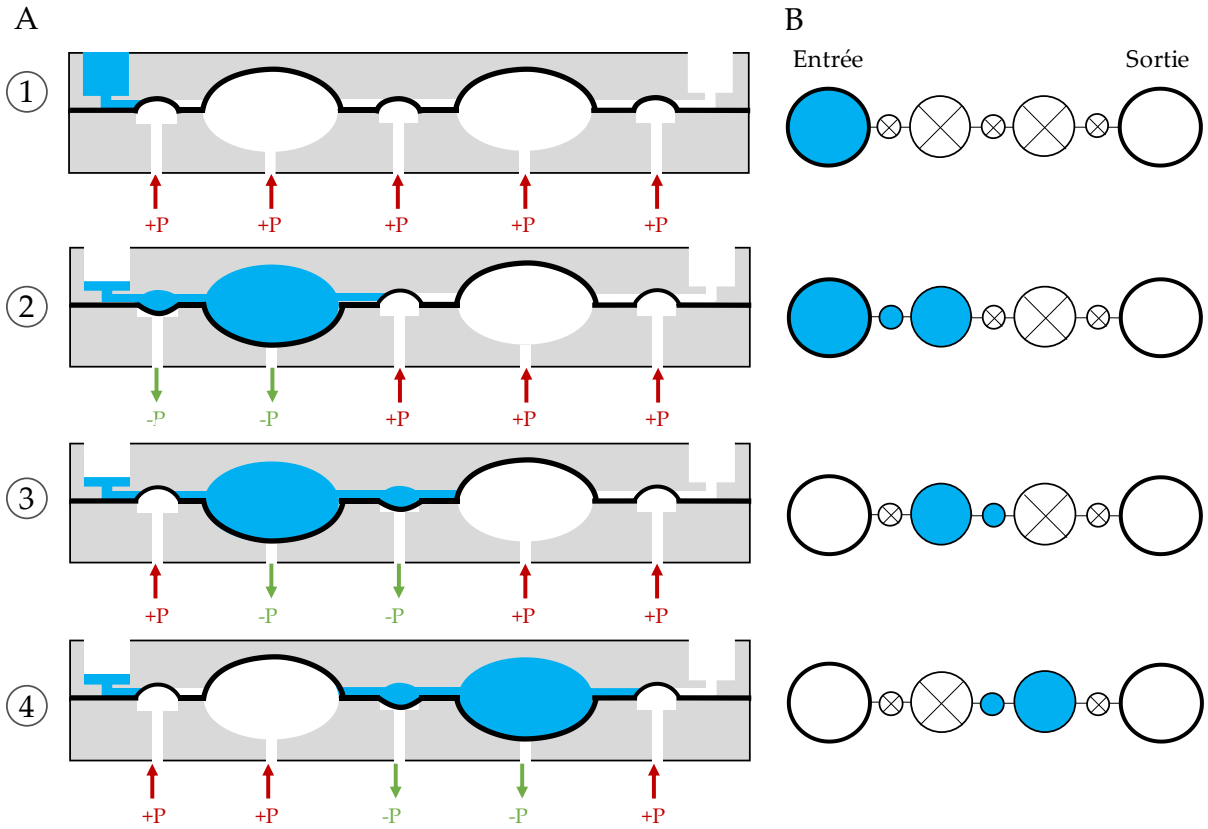


Figure III.5 : Étapes de l'actionnement pneumatique d'une cartouche FlowStretch : A - Vue en coupe schématisée, B - Vue du haut schématisée. Les étapes sont : (1) Chambres et vannes fermées, le fluide reste dans le réservoir d'entrée, (2) Ouverture de la vanne d'entrée et de la première chambre qui se remplit, (3) Fermeture de la vanne d'entrée et ouverture de la vanne intermédiaire, la chambre reste remplie, (4) Fermeture de la première chambre et ouverture de la deuxième, le fluide se déplace d'une chambre à une autre.

La technologie FlowStretch a déjà démontré son utilité pour le développement de protocoles biologiques intégrés en microfluidique tels que des tests ELISA [87] ou PCR[149], avec une gestion automatisée de plusieurs fonctions fluidiques (calibration de volumes, mélanges, lavages). Elle a aussi déjà été utilisée pour la culture d'organoïdes [61], [160].

Plusieurs méthodes d'actionnement fluidiques peuvent être couplées avec cette technologie. Dans notre cas, nous nous intéressons à l'actionnement par cycle péristaltique et à l'actionnement en flux continu.

ii. Micro-pompe pneumatique : actionnement fluidique par cycle péristaltique

À partir de la technologie Flowstretch, une micro-pompe pneumatique a été développée au sein du laboratoire LSMB du CEA Leti [139]. La micro-pompe est composée d'une succession de trois vannes pneumatiques. Pour déplacer le fluide, celles-ci sont actionnées séquentiellement, sous forme de cycles péristaltiques (Figure III.6). Avec cette méthode d'actionnement intégrée, aucun instrument externe fluidique n'est nécessaire.

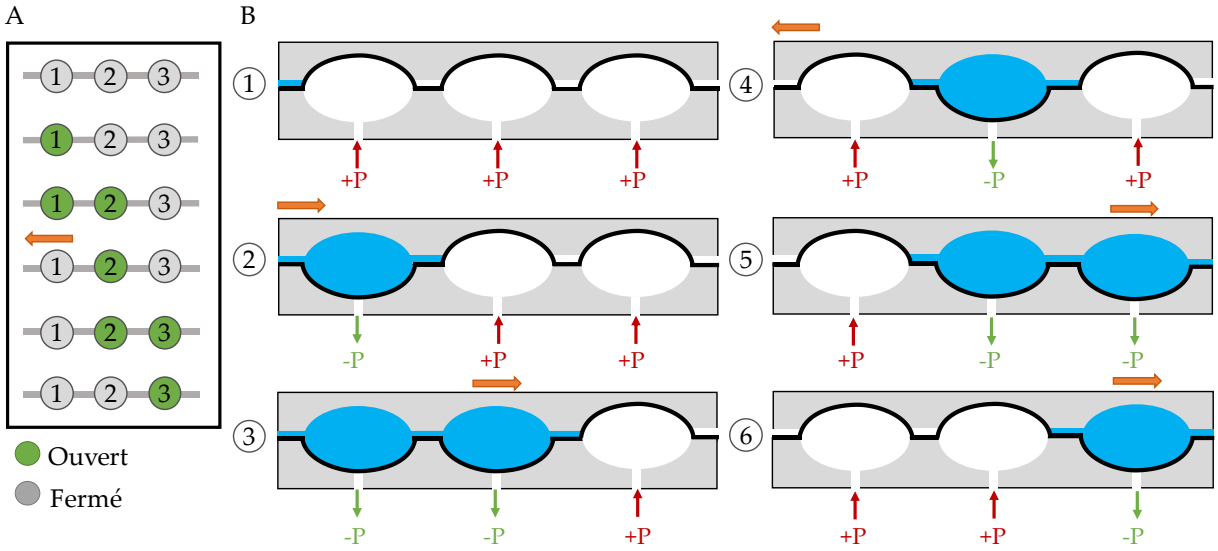


Figure III.6: Principe de fonctionnement de la micro-pompe, A-Ordre d'actionnement pour réaliser un cycle péristaltique, B - Vue schématisée en coupe détaillant les pressions positives et négatives appliquées pour actionner le cycle.

Un autre avantage de ce mode d'actionnement est que lorsque des bulles apparaissent, le débit n'est pas interrompu [161]. La gamme de débit de ce type d'actionnement dépend du volume et de la vitesse d'actionnement des vannes composant la micro-pompe. La vitesse d'actionnement dépend du temps d'attente (tempo) entre l'actionnement de chacune des pompes.

L'une des particularités de ce type de micro-pompe intégrée est qu'un reflux a lieu au moment de la fermeture de la première vanne, comme le montre la Figure III.6 (flèche orange). Ce reflux peut être problématique en fonction des applications souhaitées. Par exemple, certains capteurs sensibles à l'instabilité du flux, tels que les Mach-Zehnder, ne pourront pas être utilisés avec ce type d'actionnement. Dans certains cas, ce flux pulsatile peut être bénéfique, notamment pour les organoïdes-sur-puce, car il permet de reproduire certaines conditions physiologiques telles que le flux sanguin [162].

Avec cette technique, un contrôle précis du débit n'est pas possible à cause de l'élasticité de la membrane. C'est pourquoi une autre méthode de contrôle de fluides en flux continu a été proposée.

iii. Microfluidique en flux continu par régulation de pression

Le second type d'actionnement fluidique proposé repose sur une approche en flux continu. Le principe est de relier la sortie de la cartouche microfluidique à une source d'aspiration externe et d'utiliser les micro-vannes pneumatiques pour aiguiller le fluide au sein de la cartouche. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser un réservoir dépressurisé directement relié à un contrôleur de pression négative comme source d'aspiration (Figure III.7). La vitesse d'écoulement est donc contrôlée à partir de la différence de pression appliquée dans la cartouche. Plus celle-ci est élevée, plus le débit augmente.

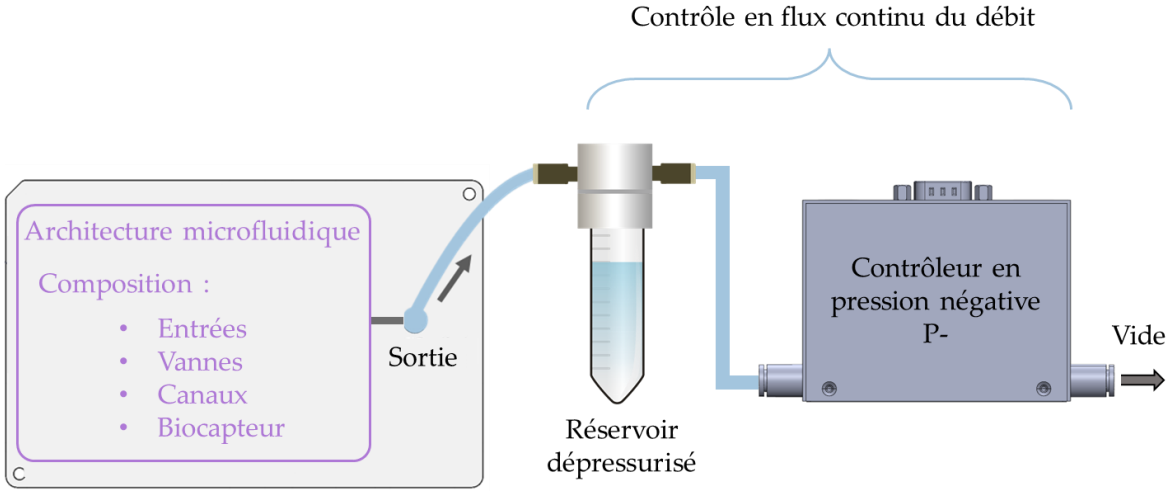


Figure III.7 : Cartouche microfluidique reliée au réservoir dépressurisé pour un contrôle des fluides en continu.

Un exemple simplifié de circuit fluidique est représenté sur la Figure III.8.A. Pour actionner et orienter le fluide, des vannes pneumatiques sont associées à chaque élément de la cartouche comme les entrées, les intersections de canaux et les sorties, pour isoler ces sections les unes des autres. Lorsque ces vannes sont fermées, celles-ci sont étanches et aucun fluide ne peut circuler car la pression négative appliquée à ces vannes (-600 mbar) est toujours supérieure à la pression négative (aspiration) appliquée en sortie. En activant les vannes correspondant au trajet fluidique souhaité, le fluide se déplace dans la cartouche (Figure III.8.B). Cela ne se produit que si la vanne de sortie est ouverte. Cette méthode permet de délivrer en continu les échantillons sans discontinuité d'écoulement ni phénomène de reflux.

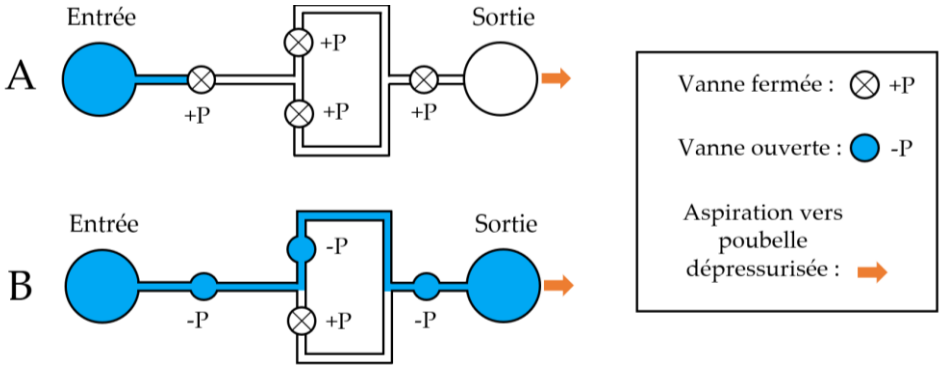


Figure III.8 : Exemple de circuit relié au réservoir dépressurisé, A -Toutes les vannes du circuit sont fermées, empêchant le fluide de circuler, B – Certaines vannes du circuit sont ouvertes, permettant le passage du fluide dans une direction en particulier.

III.2 Conception et validation des cartouches microfluidiques en fonction de l'actionnement fluidique

Le développement d'une cartouche microfluidique nécessite deux étapes clefs : la conception de l'architecture et la validation fluidique du système. La conception de l'architecture est directement influencée par l'actionnement fluidique utilisé.

III.2.1 Cartouche microfluidique pour l'actionnement en flux continu

L'actionnement en flux continu a été choisi dans un premier temps pour développer le protocole d'immunodétection multi-étapes intégré en microfluidique et caractérisé dans le chapitre IV. C'est donc à partir de cet actionnement que les premières architectures ont été conçues.

i. Conception de l'architecture microfluidique

L'architecture fluidique doit être conçue pour permettre le déplacement de plusieurs réactifs (échantillons, solutions de lavage) dans les différentes zones de détection du biocapteur pour réaliser le protocole de biodétection.

Le circuit microfluidique, proposé sur la Figure III.9, comporte plusieurs entrées, toutes reliées aux 7 zones de détection du biocapteur, via un canal central et directement reliées à la sortie via deux autres canaux. Les 7 zones de détection du biocapteur sont également reliées toutes ensemble vers la sortie. Les deux autres canaux connectés à cette sortie sont utilisés pour purger la cartouche microfluidique et ainsi assurer qu'aucune bulle d'air ne se trouve dans le circuit. Un exemple d'injection est représenté sur la Figure III.9 avec le déplacement d'un échantillon bleu dans le réservoir d'une des entrées, vers l'une des zones de détection. Ce circuit microfluidique permet donc de réaliser des protocoles multi-étapes d'injection dans le biocapteur.

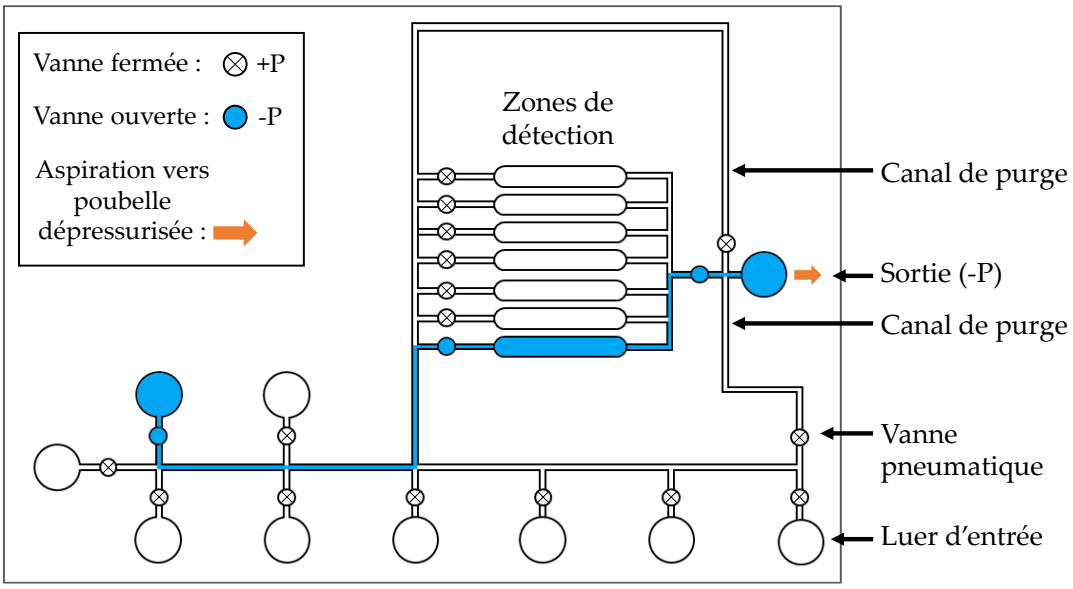


Figure III.9 : Exemple du contrôle directionnel (ou d'aiguillage) du fluide dans la cartouche microfluidique grâce aux vannes pneumatiques.

ii. Cartouche microfluidique intégrant le biocapteur

La Figure III.10 présente la cartouche finale composée du circuit fluidique combiné à l'intégration modulaire du biocapteur. Un exemple de protocole illustre également la versatilité de la cartouche, capable de manipuler plusieurs échantillons dans les 7 zones de détection.

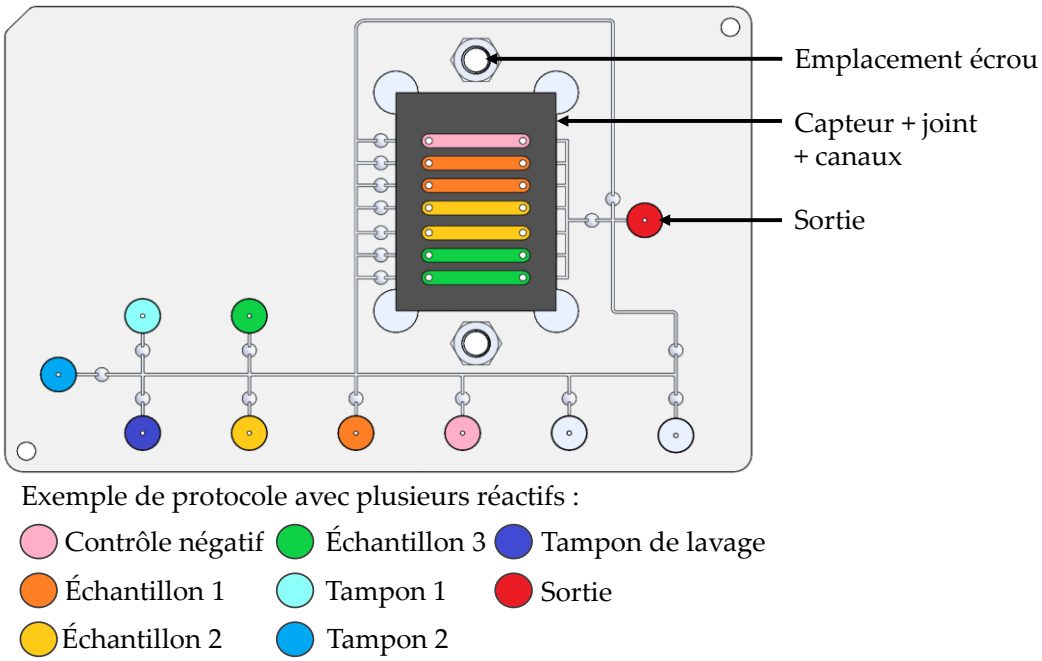


Figure III.10 : Architecture de la cartouche microfluidique intégrant le biocapteur composé de 7 zones de détection indépendantes. Un exemple de protocole est proposé montrant la versatilité de l'architecture : Plusieurs entrées permettant de travailler avec différents réactifs (les échantillons et tampons de lavage). L'exemple propose d'injecter 3 échantillons différents en duplicat dans les canaux de détection, en plus d'un contrôle négatif.

L'assemblage final de la cartouche est représenté en vue éclatée sur la Figure III.11, avec ses différentes couches de matériaux.

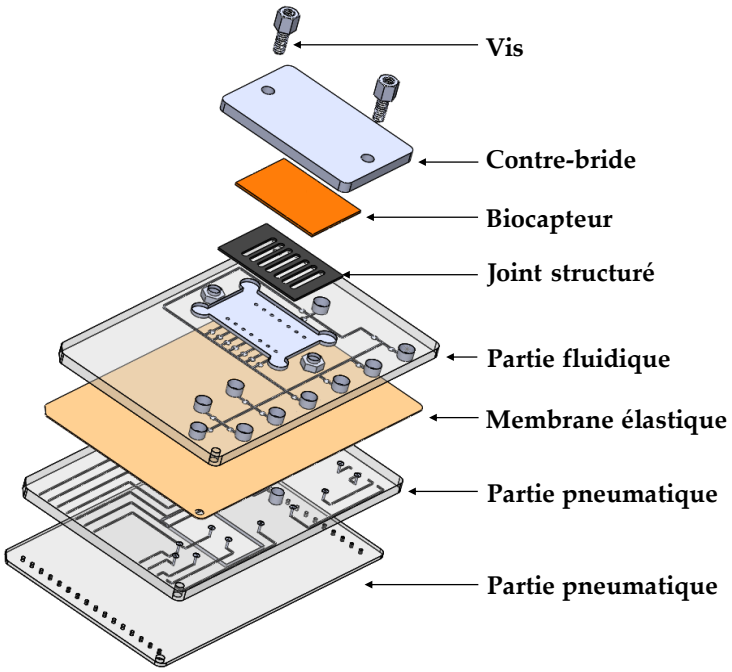


Figure III.11 : Assemblage final de la cartouche microfluidique.

iii. Caractérisation et validation de l'actionnement fluidique dans la cartouche

La caractérisation de l'actionnement en flux continu a été réalisée à l'aide d'un débitmètre (Flow Unit, Fluigent) placé en sortie de la cartouche microfluidique, comme indiqué sur la Figure III.12. Rappelons que la cartouche est directement insérée dans le banc microfluidique au niveau du FlowPad pour le contrôle pneumatique des micro-vannes (chapitre II). Le débitmètre, quant à lui, est contrôlé avec le logiciel Uflu comme pour les autres instruments du banc, mais aussi avec le logiciel OxyGEN développé par l'entreprise Fluigent.

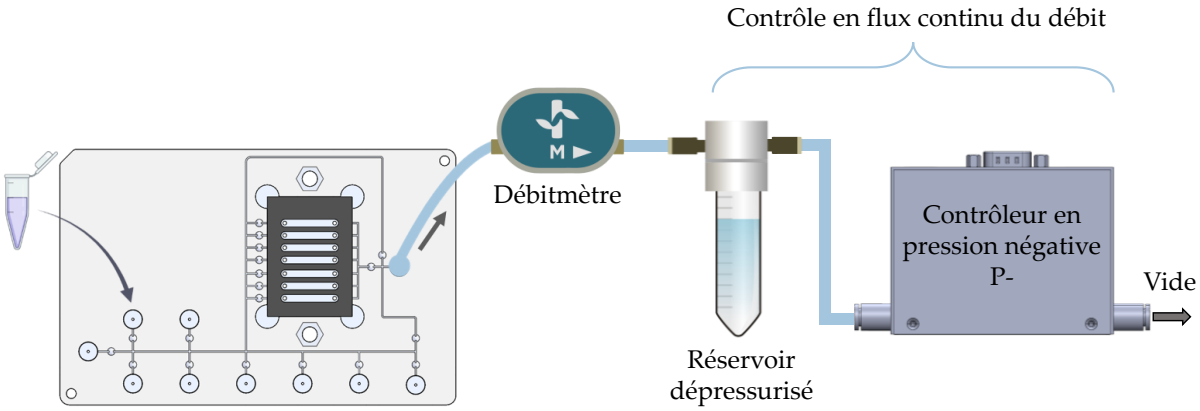


Figure III.12 : Vue schématique du circuit fluidique avec le contrôle en flux continu grâce au réservoir dépressurisé connecté au contrôleur en pression négative. Le débitmètre est positionné entre la sortie de la cartouche et le réservoir.

Il est possible d'utiliser deux modes de régulation :

- Contrôle en pression : une pression est renseignée, le régulateur va chercher à maintenir cette pression stable. Le débitmètre sert seulement à mesurer le débit en temps réel.

- Contrôle en débit : une consigne de débit est renseignée, le régulateur de pression va ajuster la pression pour maintenir ce débit à l'aide d'une boucle de rétrocontrôle (fonction fournie par une librairie Fluigent) à partir des données de débit fournies par le débitmètre.

L'option du contrôle en débit nous assure que celui-ci reste le même au cours de l'expérimentation. Il faut savoir que les bulles d'air sont la cause principale de perturbation du débit dans une cartouche microfluidique. En effet, le passage d'une bulle peut créer une perte de charge. Il faut alors augmenter la différence de pression pour maintenir un débit constant. Un test a été réalisé pour voir l'efficacité de la régulation par débitmètre face à ce type de perturbation.

- Caractérisation de la régulation par contrôle en débit

Pour ce test, on applique une consigne à 50 µL/min puis à 100 µL/min. La Figure III.13 (étapes 1 et 2) représente l'évolution du débit et de la pression négative pour ces deux consignes. Une consigne à 50 µL/min correspond à une pression oscillant autour de - 50 mbar, tandis qu'une consigne de 100 µL/min conduit à une pression d'environ - 100 mbar. Pour ces deux conditions, le débit mesuré est stable. Une bulle d'air est ensuite injectée volontairement dans le système à l'étape 3. Piégée dans le tube de sortie, cette bulle d'air provoque une chute du débit jusqu'à son arrêt. Grâce à la boucle de rétrocontrôle, le régulateur de pression applique une pression négative plus élevée (> - 350 mbar) pour compenser la perte de débit se traduisant par un pic de pression négative. En revanche, lorsque la bulle d'air est évacuée, le débit augmente drastiquement jusqu'à plus de 1000 µL/min (saturation du débitmètre), en réponse à cette chute de pression. Il se stabilise ensuite de nouveau à 100 µL/min (étapes 3 et 4) lorsque la pression augmente.

Dans le cas où plusieurs bulles d'air sont injectées simultanément dans le système et se retrouvent piégées dans le tube de sortie (étape 5), une forte diminution de la pression (< - 400 mbar) ne permet pas de les évacuer. Dans cette configuration, le système est incapable d'atteindre la consigne de débit et reste bloqué à une pression négative élevée.

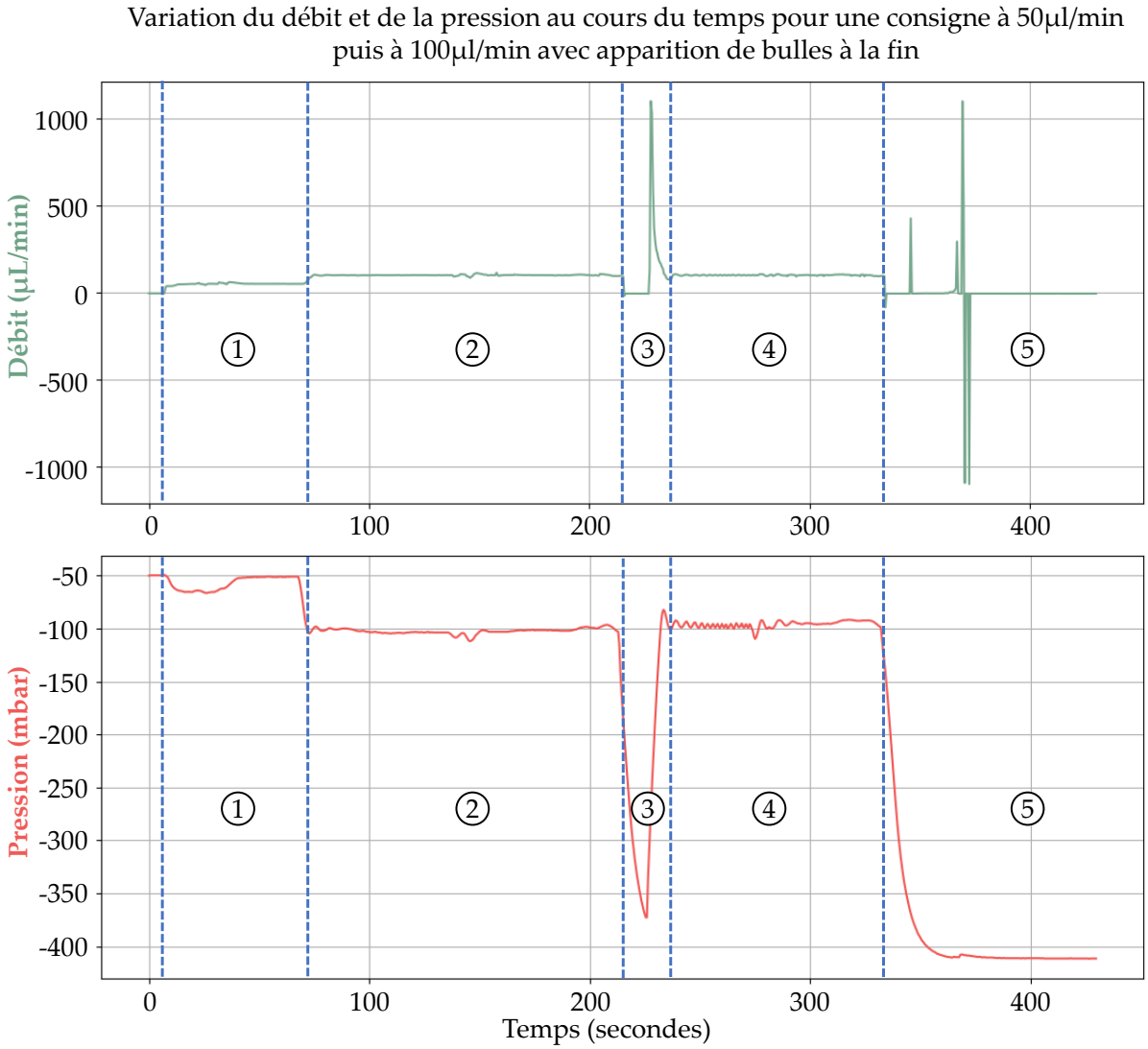


Figure III.13 : Variation du débit et de la pression au cours du temps, (1) Consigne à 50 µL/min, (2) Consigne à 100 µL/min, (3) Injection volontaire d'une bulle dans le circuit fluidique, (4) Stabilisation après la perturbation à 100 µL/min, (5) Injection volontaire de plusieurs bulles.

Les résultats de ce test indiquent que, malgré l'utilisation du débitmètre pour la régulation de la pression, la stabilisation du débit demeure difficile, voire impossible, après apparition de plusieurs bulles d'air. De plus, les fortes variations de débits observées pour maintenir la consigne ne sont pas compatibles avec l'obtention de résultats expérimentaux reproductibles. Les fluctuations élevées de la pression négative sont également susceptibles d'endommager la membrane élastique de la cartouche microfluidique sur le long terme. Par conséquent, la régulation par contrôle de débit n'est pas adaptée au projet de thèse. Le débitmètre servira donc seulement comme outil de contrôle, afin de mesurer le débit en temps réel lors des expérimentations.

- Caractérisation de la régulation par contrôle en pression

Un second test est réalisé pour étudier la méthode utilisant une consigne en pression rétrocontrôlée. La Figure III.14 montre l'évolution du débit en fonction de la diminution de la consigne en pression. Tout d'abord, on observe que la pression prend une dizaine de secondes

à se stabiliser pour chaque nouvelle consigne. Ce délai est donc à prendre en compte si l'on souhaite travailler avec un débit stable. Des variations du débit sont également visibles. Observées à partir d'une consigne de – 100 mbar, elles peuvent s'expliquer par le passage de bulles d'air dans le système (non volontaire). Dans cette configuration, si une ou plusieurs bulles d'air restent piégées dans le tube de sortie, le débit chute ou s'arrête totalement. En effet, en l'absence de rétrocontrôle, la consigne en pression reste constante, ce qui ne permet pas de débloquer le système et nécessite une intervention manuelle.

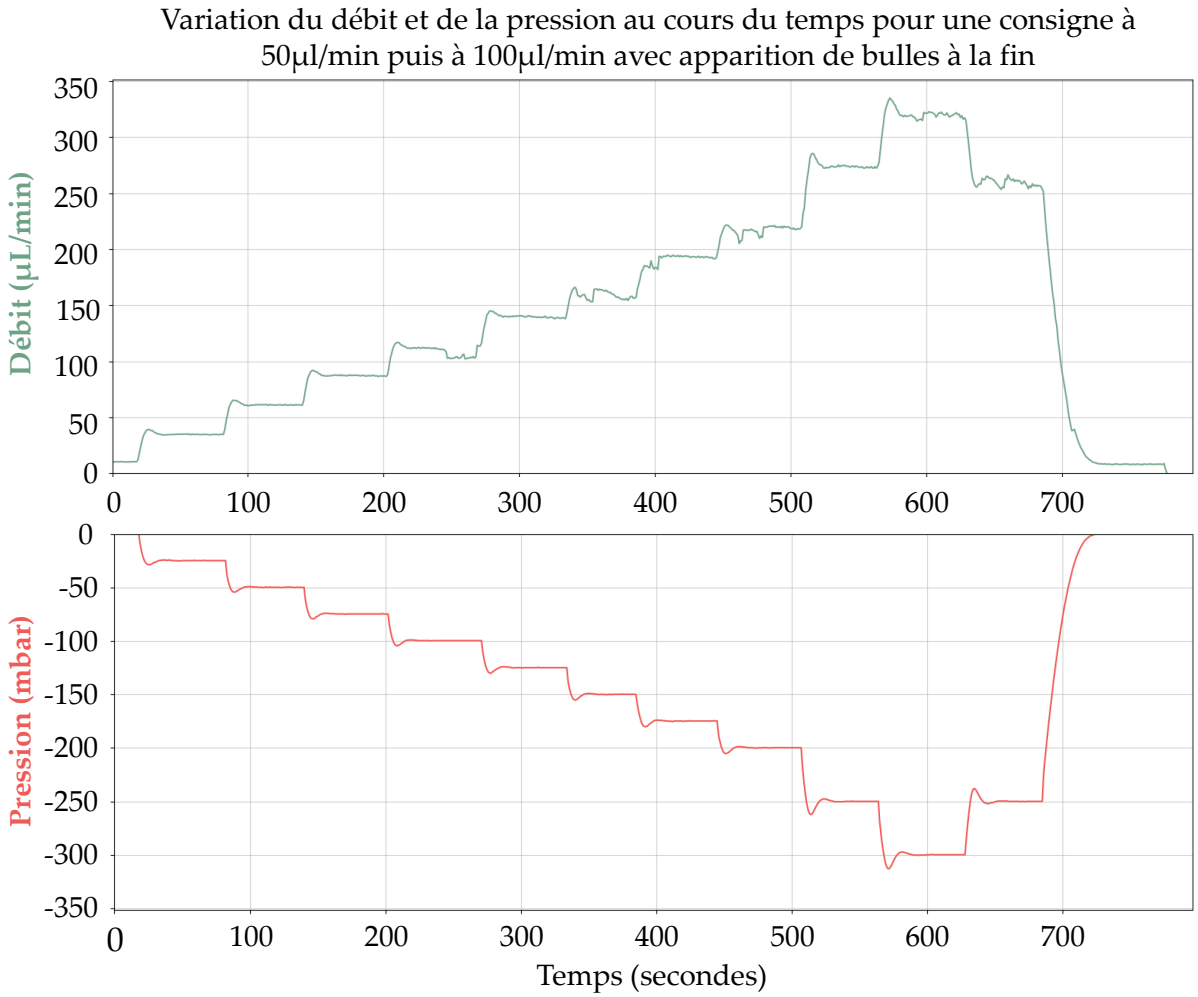


Figure III.14 : Évolution du débit en fonction de la consigne en pression. La pression diminue par tranche de -25 mbar.

- Validation fluidique de la cartouche avec l'actionnement en flux continu

Pour valider le fonctionnement de la cartouche, un liquide fluorescent a été injecté successivement dans chacun des canaux du biocapteur ainsi qu'un tampon de PBS 1X à un débit de 50 µL/min. Les canaux ne sont pas préalablement remplis de liquide. Comme le montre la Figure III.15, le liquide fluorescent s'injecte facilement dans le canal sans aucune fuite et sans bulles d'air. Par la suite, l'injection du PBS démontre qu'il est possible de nettoyer les canaux sans laisser de trace apparente de la première injection. En effet, avant injection du liquide fluorescent, l'intensité lumineuse est d'environ 0,5 U.A (unité arbitraire) d'intensité puis passe à 137 U.A d'intensité une fois le liquide dans le canal. Après 15 secondes de lavage,

l'intensité retombe à une valeur de 1 U.A, ce qui confirme l'efficacité du lavage. Le système permet ainsi d'enchaîner plusieurs injections d'échantillons différents tout en restant étanche. Ces validations fluidiques démontrent que la cartouche développée est fonctionnelle et adaptée à la mise en œuvre de protocoles fluidiques.

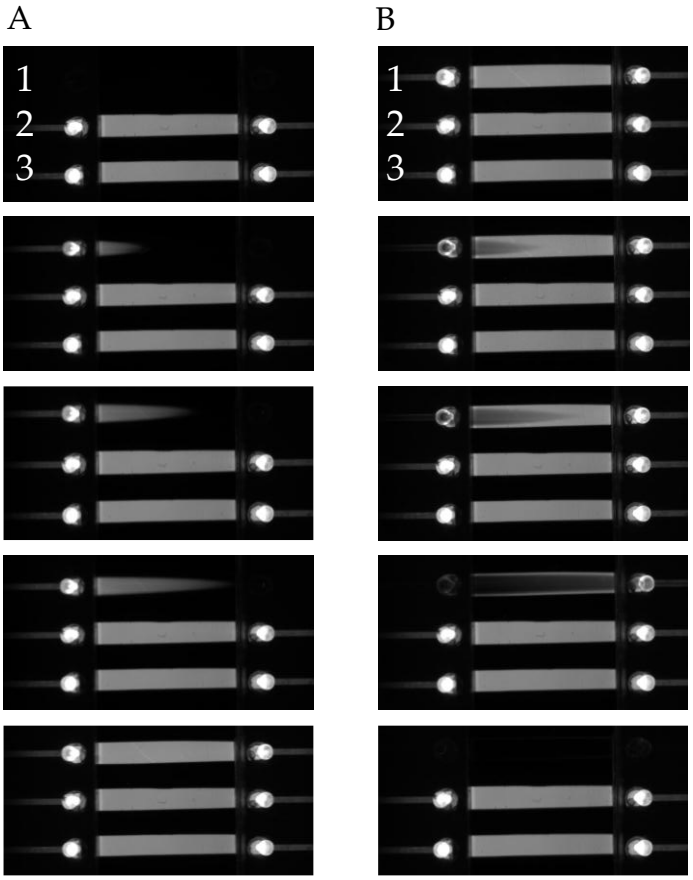


Figure III.15 : Exemple d'injection et de lavage d'un liquide fluorescent A – Injection d'un liquide fluorescent dans le canal 1, B – Injection de PBS dans le même canal qui nettoie progressivement tout le liquide fluorescent.

iv. Discussion

Cette méthode d'actionnement en flux continu permet de contrôler précisément le débit d'injection des liquides. Cependant elle est également très sensible aux bulles d'air, notamment à cause des dimensions du tube de sortie, qui relie la cartouche au réservoir. Son diamètre étant de 250 µm, les bulles d'air sont facilement piégées à l'intérieur. Une solution pour pallier ce problème serait d'utiliser un tube de sortie de 500 µm de diamètre. Cependant, ce diamètre de tube n'est pas compatible avec les débits requis pour l'application, étant donné que celui-ci est proportionnel à la quatrième puissance du rayon du tube, conformément à la loi de Poiseuille :

$$Q = \frac{\pi . \Delta P . r^4}{8 . \eta . L}$$

Avec Q le débit en (m^3/s), ΔP la différence de pression entre deux extrémités du tube, r le rayon interne du tube, η la viscosité dynamique du fluide, L la longueur du tube.

En effet, en considérant un écoulement laminaire d'eau avec une viscosité dynamique η de $1{,}00 \times 10^{-3}$ Pa.s dans un tube de longueur L = 15 cm soumis à une différence de pression ΔP = 50 mbar ($5{,}0 \times 10^{3}$ Pa), la loi de Poiseuille permet de calculer un débit théorique de $3{,}19 \times 10^{-9}$ m^3/s, soit 192 µL/min. À pression et longueur identiques, le remplacement par un tube de 500 µm de diamètre conduit à un débit théorique d'environ 3068 µL/min, soit un facteur 16 plus élevé, conformément à la dépendance en r^4. Cette augmentation est donc incompatible avec les débits souhaités. Idéalement, pour conserver le débit de 192 µL/min en travaillant avec un tube de 500 µm de diamètre, il faudrait que celui-ci mesure environ 2,4 m de longueur pour compenser l'augmentation du diamètre. Une telle augmentation n'est pas envisageable dans notre cas.

Pour parer à ce problème lié aux bulles d'air, sans changer de tube, une autre solution est de purger l'air de tous les canaux de la cartouche avant son utilisation. Cette solution est notamment abordée dans le chapitre IV. De plus, il faut s'assurer que la connexion entre le luer de sortie et le tube soit étanche pour ne pas aspirer l'air extérieur lorsque les vannes de sortie sont fermées. Malgré cela, il reste difficile de travailler avec de faibles débits sur le système microfluidique (en dessous de 50 µL/min) et les expérimentations doivent être réalisées sous surveillance afin de vérifier la stabilité du débit.

Pour pallier les désavantages de l'actionnement en flux continu, une autre méthode d'actionnement a été proposée. Les instruments externes tels que les pousse-seringue ou les pompes péristaltiques ont l'avantage de proposer un flux plus stable et robuste. Cependant, si l'on prend en compte le contexte des organoïdes, avoir plusieurs cultures d'organoïdes dans une même cartouche est un enjeu pour l'étude de ces modèles. La parallélisation des cultures et de l'analyse des sécrétions avec l'utilisation d'instruments externes serait à la fois coûteuse, encombrante et complexe, notamment pour la gestion fluidique et la maintenance du système. C'est pourquoi nous avons choisi d'intégrer une micro-pompe pneumatique dans la cartouche microfluidique.

III.2.2 Cartouche microfluidique intégrant une micro-pompe

Les premières ébauches d'architecture microfluidique, incluant un contrôle en volume des liquides, étaient basées sur l'utilisation de chambres de volumes calibrés pour l'injection des fluides dans les canaux de détection. Cependant cette méthode n'était pas adaptée au projet de thèse (Annexe G). C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'intégration de micro-pompes dans la cartouche. À partir de cette méthode, une nouvelle architecture microfluidique a été développée et caractérisée en se basant sur celle présentée précédemment.

i. Architecture de la cartouche microfluidique intégrant une micro-pompe

Une nouvelle architecture microfluidique a été conçue en intégrant deux micro-pompes de tailles différentes (Figure III.16). La première micro-pompe, nommée « grande pompe », est composée d'une chambre de 10 µL entourée d'une vanne de chaque côté. La seconde, nommée « petite pompe », est composée de 3 chambres de 2 µL. Quatre entrées sont utilisées comme réservoirs pour les échantillons et sont placées à proximité du biocapteur pour diminuer les volumes morts. Les trois autres entrées, positionnées en bas à gauche du biocapteur, servent

de réservoirs pour les solutions tampons. Une seconde chambre, ainsi qu'une vanne associée, ont été ajoutées en amont du biocapteur pour réaliser des allers-retours d'un même échantillon dans les canaux de détection et pour étudier l'impact de ce paramètre sur les performances de biocapture. Cependant, par manque de temps, ce test n'a pas pu être réalisé pendant cette thèse.

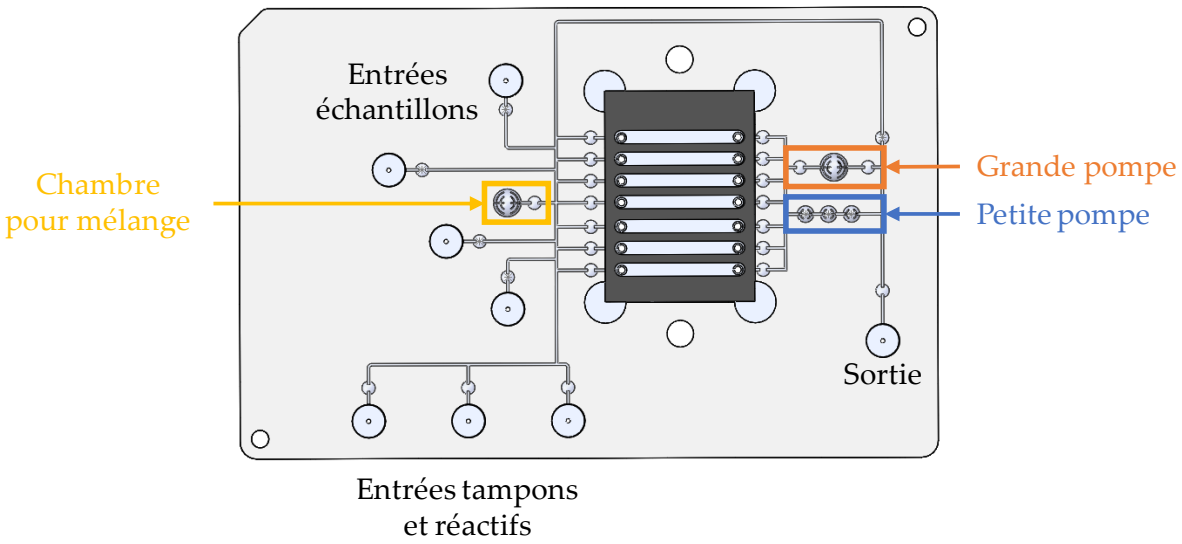


Figure III.16 : CAO de la nouvelle architecture microfluidique intégrant les deux micro-pompes en aval du biocapteur et une chambre microfluidique en amont du biocapteur.

Les chambres microfluidiques se distinguent des vannes pneumatiques par leur géométrie. Les chambres sont de forme sphérique (Figure III.17.1) tandis que les vannes pneumatiques sont de forme semi-cylindrique avec une base rectangulaire (Figure III.17.2). La forme sphérique des chambres microfluidiques permet un remplissage plus précis que la forme des micro-vannes, car cette géométrie favorise une déformation plus homogène et plus reproductible de la membrane, améliorant ainsi la reproductibilité du remplissage. C'est pourquoi il a été décidé de travailler avec elles car l'actionnement par micro-pompe intégrée repose sur un contrôle en volume qui se doit d'être précis.

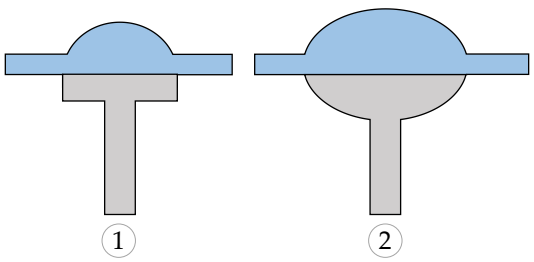


Figure III.17 : Représentation schématique des différences de géométrie entre une vanne pneumatique (1) et une chambre microfluidique (2). La forme sphérique de la chambre microfluidique permet une meilleure reproductibilité de remplissage.

Lorsque des micro-vannes sont utilisées, une pression positive de 600 mbar est appliquée pour éviter les fuites. En ce qui concerne les chambres microfluidiques, une pression de 350 mbar est appliquée. Il faut donc rajouter un contrôleur de pression positive sur le banc microfluidique pour dissocier la pression des chambres et des vannes.

ii. Caractérisation de l'actionnement par micro-pompe

La caractérisation de ces micro-pompes porte sur la reproductibilité de leur actionnement et sur les gammes de débits atteignables. L'influence du reflux sur l'écoulement est également examinée.

- Reproductibilité du cycle et caractérisation du volume

Pour étudier la reproductibilité d'un cycle péristaltique, un test a été réalisé à l'aide d'eau osmosée et est présenté sur la Figure III.18. Dans un premier temps la pompe est actionnée pour 10 cycles (Figure III.18.1) puis le liquide en sortie est récolté dans un Eppendorf (Figure III.18.2). La masse d'eau collectée est ensuite mesurée à l'aide d'une balance analytique d'une précision de ± 0,1 mg (Figure III.18.3). En supposant une densité de l'eau déionisée égale à 1 g/mL à température ambiante, la masse mesurée a été assimilée à son volume équivalent. Théoriquement après 10 cycles, 20 µL doivent être récoltés avec la petite pompe de 2 µL et 100 µL avec la grosse pompe de 10 µL. La reproductibilité des résultats peut être évaluée à l'aide du coefficient de variation (CV), défini comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne des données.

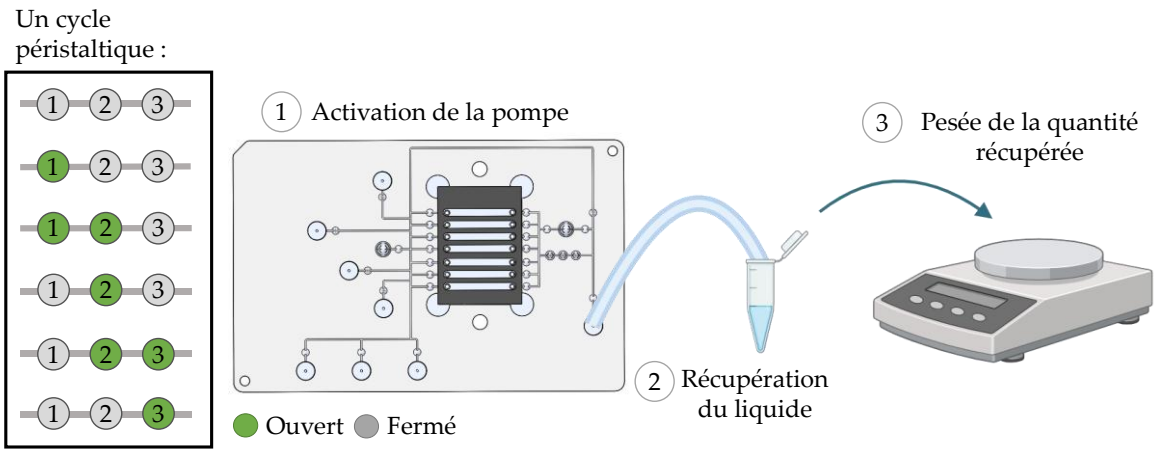


Figure III.18 : Vue schématique de l'expérimentation avec (1) l'actionnement d'une micro-pompe au choix (petite ou grosse), (2) récupération du liquide déplacé, (3) pesée de la masse récupérée.

La Figure III.19 présente les résultats obtenus pour les deux pompes. Pour chacune d'elles, deux tests ont été réalisés sur deux jours différents, avec la même cartouche microfluidique. Dix cycles péristaltiques ont été effectués 5 fois pour deux vitesses d'actionnement distinctes lors de chaque test, correspondant à deux temps d'attente différents entre l'activation de chaque pompe (tempo = 0,1 s et 1 s).

Pour la petite pompe (Figure III.19), les volumes mesurés sont systématiquement inférieurs au volume théorique attendu (20 µL). Pour le test n° 1, les volumes d'eau équivalents mesurés sont de 13,0 µL et 13,7 µL respectivement pour des tempos de 0,1 s et 1 s avec des CV inférieurs à 2,8 %, traduisant une très bonne reproductibilité d'actionnement mais un rendement inférieur aux résultats théoriques attendus. En effet, les rendements expérimentaux correspondent à 64,8 % et 68,3 % du rendement théorique respectivement pour les temps 0,1 s et 1 s, le tempo de 1 s semblant offrir un meilleur rendement. Ce phénomène peut être attribué

au temps supplémentaire accordé à la membrane pour se déformer et ainsi mieux remplir la chambre.

Le même constat est observé pour le test n° 2, avec un meilleur rendement pour le tempo de 1 s. De plus, les rendements sont plus élevés à hauteur de 81,1 % (tempo 0,1 s) et 87,5 % (tempo 1 s) au détriment des coefficients de variation qui augmentent entre 6,0 % et 9,1 %, restant tout de même satisfaisants.

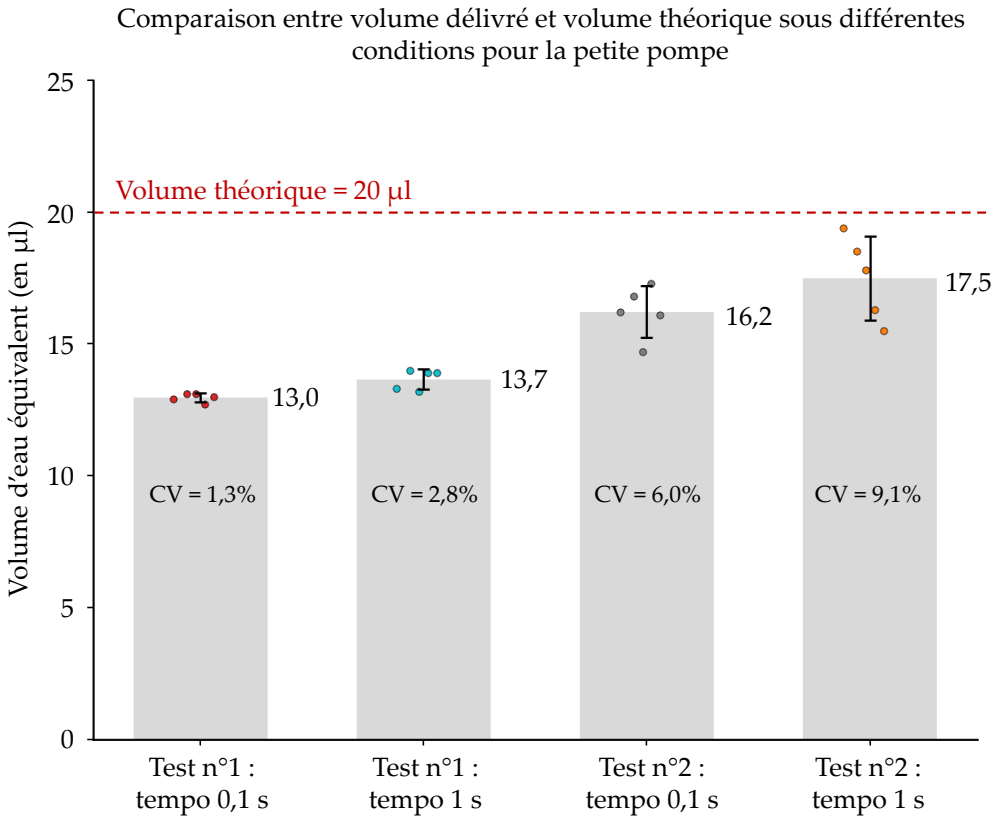


Figure III.19 : Histogramme des volumes équivalents récupérés (en mL) pour chaque condition de tempo (0,1 s ou 1 s) et chaque test, après 10 cycles péristaltiques de la petite pompe.

Rendement	**Test n°1 tempo 0,1s**	**Test n°1 tempo 1s**	**Test n°2 tempo 0,1s**	**Test n°2 tempo 1s**
Grosse pompe	89,9 %	90,86 %	86,72 %	91,14 %
Petite pompe	64,8 %	68,3 %	81,1 %	87,5 %

Tableau III.2 : Rendement de la grosse pompe et de la petite pompe pour chaque condition de tempo (0,1 s ou 1 s) et chaque test.

En ce qui concerne la grosse pompe, dans les deux conditions et pour les deux expérimentations, les coefficients de variation sont inférieurs à 1 %, ce qui montre une très bonne reproductibilité des résultats (Figure III.20). Les rendements sont également plus élevés, compris entre 86,72 % et 91,14 %. Comme pour la petite pompe, le tempo de 1 s conduit à un meilleur rendement.

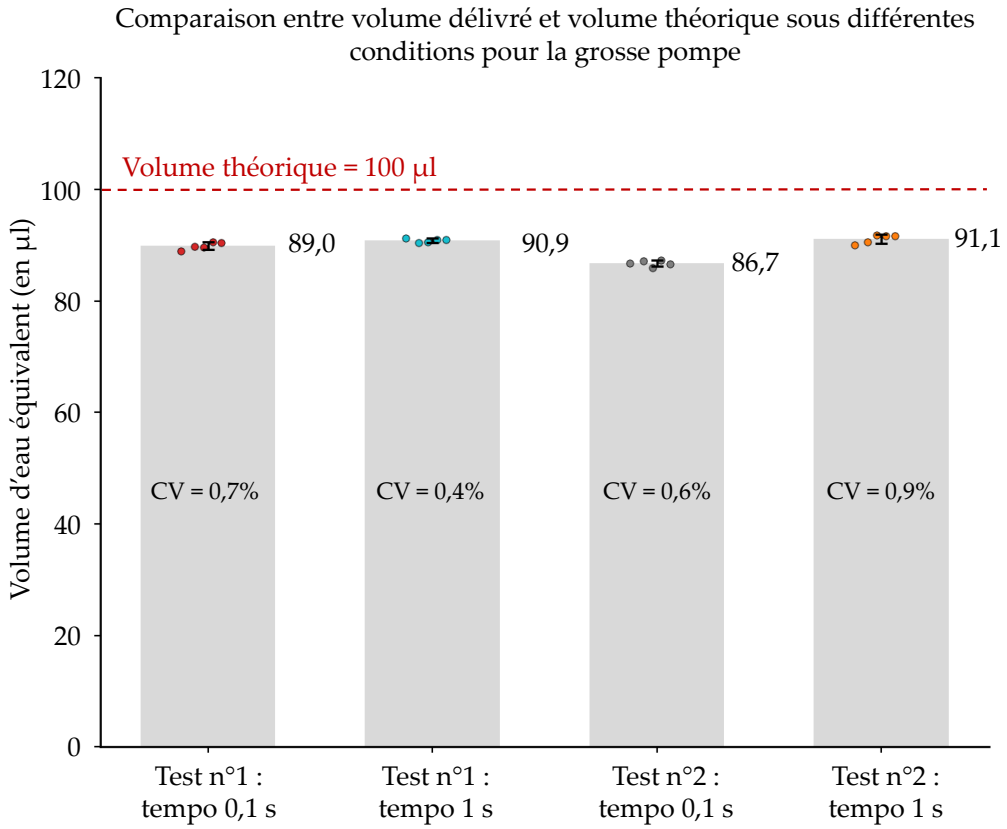


Figure III.20 : Histogramme des volumes équivalents récupérés (en mL) pour chaque condition de tempo (0,1 s ou 1 s) et chaque test, après 10 cycles péristaltiques de la grosse pompe.

Dans l'ensemble, les deux micro-pompes présentent une bonne reproductibilité d'actionnement. On constate cependant que la petite pompe a des rendements plus faibles que la grosse pompe. Cette différence peut s'expliquer par la difficulté d'usiner précisément les petites chambres aux dimensions réduites par rapport à la grande chambre. L'écart de rendement observé entre le premier et le second test de la petite pompe est probablement lié aussi à la fabrication de la cartouche. La membrane, après fabrication, peut adhérer à la cartouche, limitant le remplissage des petites chambres. Après les premières utilisations, la membrane se décolle totalement, ce qui améliore le remplissage.

- Caractérisation du débit

Comme le rendement n'est pas de 100 % par rapport au débit théorique, le débit réel des micro-pompes doit être mesuré pour différents tempos. Pour cela, on applique le même test que précédemment avec l'actionnement de la micro-pompe pendant une durée de 2 minutes. La Figure III.21 montre les résultats obtenus pour les deux types de micro-pompes en fonction du tempo fixé (0,1 s, 1 s et 2 s) et le Tableau III.3 présente ces volumes convertis en débits moyens. Les valeurs théoriques correspondantes sont également indiquées. Pour un tempo de 0,1 s, les micro-pompes effectuent 48 cycles (soit 2,5 s par cycle). Lorsque le tempo est fixé à 1 s, le nombre de cycles passe à 16 (soit 7,8 s par cycle), puis à 9 pour un tempo de 2 s (soit 13,9 s par cycle).

Concernant la petite pompe, le débit moyen mesuré est de 40,25 µL/min pour un tempo de 0,1 s, correspondant à un rendement de 83,9 % par rapport au débit théorique. Pour un tempo de 1 s, le débit moyen est de 14,25 µL/min avec un rendement de 89,0 %. Le tempo de 2 s n'a pas été testé expérimentalement pour cette pompe mais le débit théorique serait de 9 µL/min. Pour la grosse pompe, les débits moyens mesurés sont de 212,2 µL/min, de 73,2 µL/min et de 43,8 µL/min respectivement pour des tempos de 0,1 s, 1 s et 2 s et correspondant à des rendements de 88,4 %, 91,5 % et 97,3 %.

Pour les deux micro-pompes, une augmentation du tempo améliore encore une fois le rendement. La reproductibilité des résultats est très bonne pour l'ensemble des conditions, avec des CV inférieurs à 2,3 %. La combinaison des deux micro-pompes permet ainsi de couvrir une large gamme de débit en ajustant le paramètre de tempo (entre 0,1 et 2 s).

Cette étude n'a porté que sur deux temps pour la petite pompe et trois tempos pour la grosse pompe, ce qui n'a pas permis d'évaluer la relation entre le tempo et le volume injecté. Une étude plus étendue, incluant plusieurs tempos (par exemple 0,1 s, 0,5 s, 1 s, 1,5 s et 2 s), aurait permis de déterminer si le volume injecté, et donc le débit, varie de manière proportionnelle au tempo, et ainsi de vérifier l'existence d'une relation linéaire.

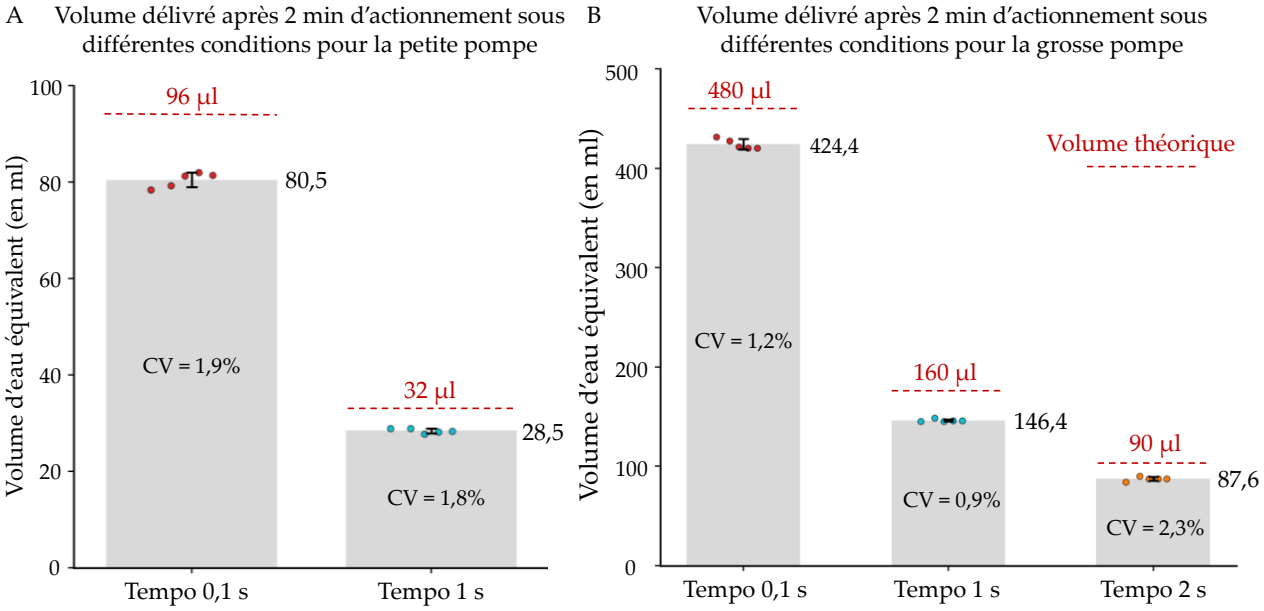


Figure III.21 : A- Histogrammes des volumes équivalents récupérés (en mL) après 2 min d'actionnement sous deux conditions de tempo (0,1 s ou 1 s), A pour la petite pompe, B- pour la grosse pompe.

A - Petite pompe

	Débit théorique	Débit mesuré
Tempo 0,1 s	48 µl/min	40,25 µl/min
Tempo 1 s	16 µl/min	14,25 µl/min
Tempo 2 s	9 µl/min	X

B - Grosse pompe

	Débit théorique	Débit mesuré
Tempo 0,1 s	240 µl/min	212,2 µl/min
Tempo 1 s	80 µl/min	73,2 µl/min
Tempo 2 s	45 µl/min	43,8 µl/min

Tableau III.3 : Débits équivalents pour différents tempos, A- pour la petite pompe, B- pour la grosse pompe.

- Étude du reflux

À l'aide du débitmètre positionné à la sortie de la cartouche, la variation du débit au cours de l'actionnement des micro-pompes a été étudiée. La Figure III.22 présente l'évolution cyclique du débit pour la grosse pompe. Le cycle est composé d'une phase de reflux suivie d'une phase d'expulsion du fluide. L'analyse des amplitudes montre un ratio moyen $\frac{|Q_{max}|}{|Q_{min}|}$ égal à 25, signifiant que l'amplitude du reflux ne représente que 4 % de celle de la phase d'expulsion. Ce résultat indique que le phénomène de reflux reste négligeable pour la grosse pompe.

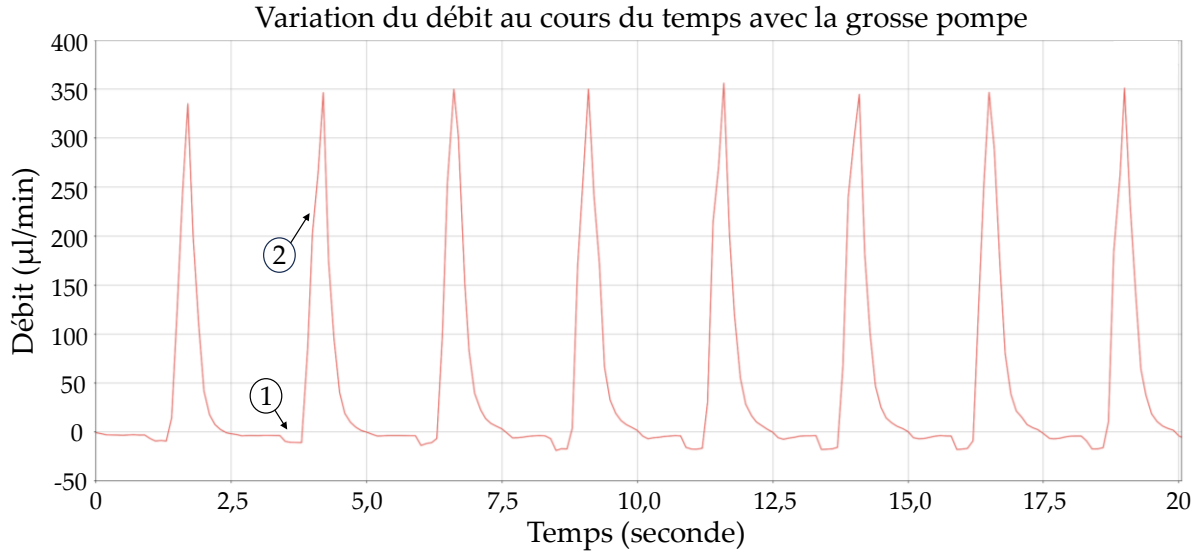


Figure III.22 : Évolution temporelle du débit pendant l'actionnement de la grosse pompe, mesuré à l'aide d'un débitmètre en sortie de la cartouche microfluidique. (1) phase de reflux de faible amplitude, (2) phase d'expulsion.

Les variations du débit au cours du temps obtenues avec la petite pompe sont nettement plus marquées (Figure III.23). Le cycle débute par une phase d'expulsion de faible amplitude (1), suivie de la phase de reflux (2). La phase d'expulsion principale apparaît ensuite, caractérisée par deux pics distincts (3), puis une phase décroissante (4) a lieu avant l'apparition d'une nouvelle phase d'expulsion de faible amplitude (5).

L'analyse des amplitudes met en évidence un ratio moyen $\frac{|Q_{max}|}{|Q_{min}|}$ égal à 1,8, ce qui signifie que la phase de reflux représente près de 56 % de la phase d'expulsion. Ce résultat témoigne d'un reflux significatif pour la petite pompe.

En moyenne, les pics de débits associés au reflux atteignent – 88 µL/min pour la petite pompe, contre seulement -16 µL/min pour la grosse pompe. Ce contraste pourrait s'expliquer par la nature du premier élément des micro-pompes. Pour la petite pompe, il s'agit d'une chambre microfluidique de 2 µL alors que celui de la grosse pompe est une vanne pneumatique de 0,6 µL. Le reflux étant généré lors de la fermeture de cet élément, son volume et sa forme semblent avoir un impact direct sur l'amplitude du reflux. Il serait donc intéressant de concevoir une nouvelle petite pompe composée d'une chambre de 2 µL et entourée de deux micro-vannes, comme pour la grosse pompe, afin de confirmer notre hypothèse sur l'influence de la phase de reflux.

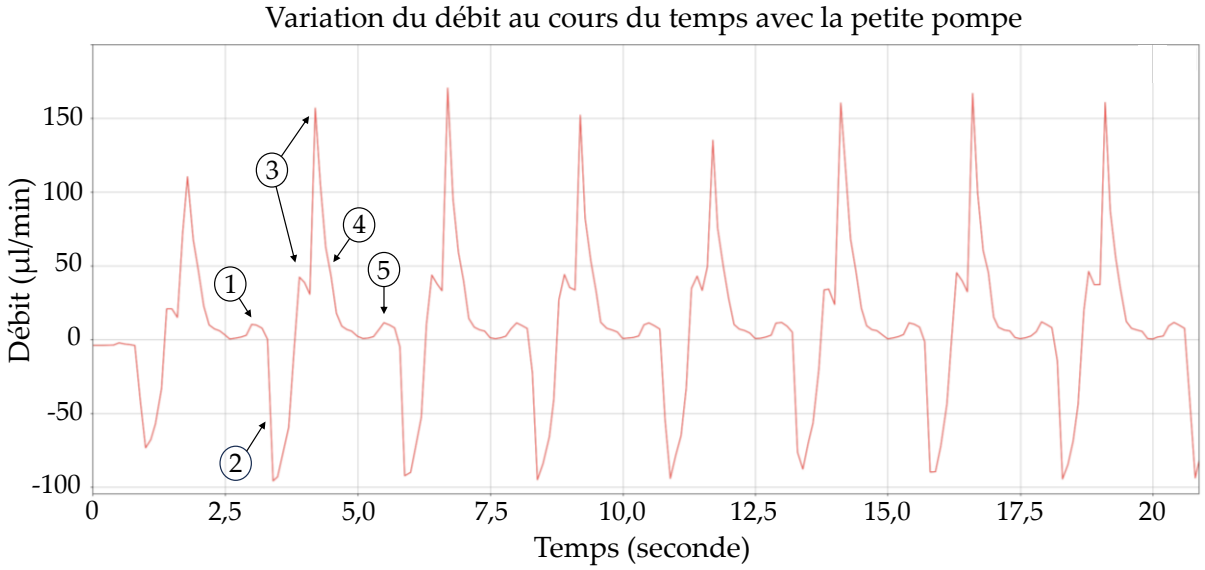


Figure III.23 : Évolution temporelle du débit pendant l'actionnement de la petite pompe, mesuré à l'aide d'un débitmètre en sortie de la cartouche microfluidique. (1) phase d'expulsion de faible amplitude, (2) phase de reflux, (3) phase d'expulsion principale avec deux pics distincts (4) phase décroissante, (5) Nouveau cycle avec la phase d'expulsion de faible amplitude.

- Validation fluidique de la cartouche avec l'actionnement par micro-pompe

Comme pour l'actionnement en flux continu, un liquide fluorescent a été injecté dans les canaux ainsi qu'un tampon de PBS 1X à l'aide des deux micro-pompes. Les canaux ne sont pas préalablement remplis de liquide. Pour la grosse pompe, actionnée à un tempo de 0,1 s (212 µL/min), le liquide fluorescent s'injecte facilement dans le canal sans aucune fuite, mais des bulles d'air sont présentes dans les canaux et restent bloquées (Figure III.24.AFigure III.25). La présence de bulles d'air a été observée à chaque nouvelle injection pour ce tempo et pour un tempo de 1 s (Figure III.24. BFigure III.25). Le PBS 1X est ensuite injecté, toujours à un tempo de 0,1 s. Avant injection du liquide fluorescent, l'intensité lumineuse dans le canal est de 0 U.A, puis elle passe à 174 U.A une fois le liquide injecté. Après 10 s de lavage au PBS 1X à un tempo de 0,1 s, l'intensité retombe à 0 U.A démontrant l'efficacité du lavage (Figure III.24.C).

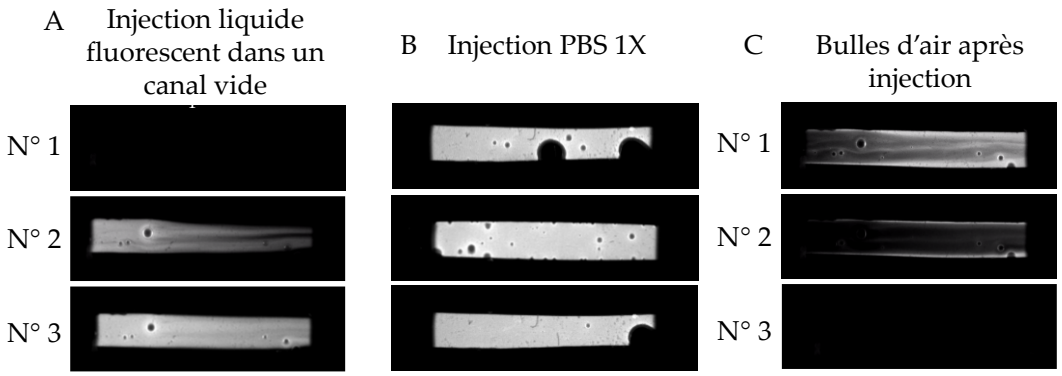


Figure III.24 : Actionnement de la grosse pompe à un tempo de 0,1 s, A- Injection du liquide fluorescent dans un canal vide, B- Introduction de bulles d'air dans les canaux, C- Lavage du canal au PBS 1X.

Pour la petite pompe, actionnée à un tempo de 0,1 s (40 µL/min), le liquide ne s'injecte pas dans les canaux qui ne sont pas préalablement remplis, probablement à cause du reflux, qui représente 56 % de la phase d'expulsion (Figure III.25.A). En revanche, la petite pompe fonctionne lorsque le canal est déjà prérempli (Figure III.25.B) et elle permet également de laver les canaux après injection du PBS 1X à un tempo de 0,1 s. Cependant, le retour à l'intensité initiale dans le canal, avant injection du liquide fluorescent, prend en moyenne 40 s (Figure III.25.C). La petite pompe nettoie donc les canaux moins efficacement qu'un actionnement en flux continu à un débit de 50 µL/min, pour lequel seulement 10 s de lavage sont nécessaires.

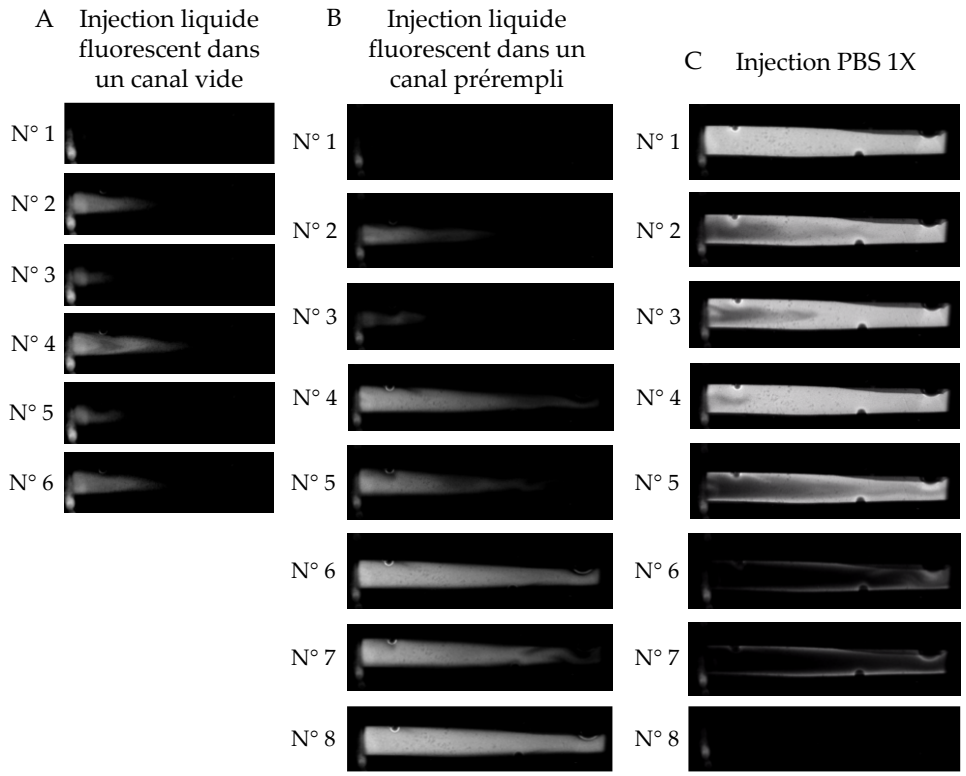


Figure III.25 : Actionnement de la petite pompe à un tempo de 0,1 s, A- Injection du liquide fluorescent dans un canal vide, ne fonctionne pas B- Injection du liquide fluorescent dans un canal prérempli, C- Lavage du canal au PBS 1X.

iii. Discussion

Ce type de micro-pompe est une alternative intéressante à l'actionnement en flux continu par aspiration, puisque l'apparition de bulles dans le système n'interrompt pas le flux. Les premières caractérisations ont toutefois montré que le volume déplacé lors d'un cycle n'est pas équivalent au volume théorique, bien que les cycles restent tout de même reproductibles entre eux. Le phénomène de reflux observé est particulièrement important pour la petite pompe. Cette caractéristique peut être un inconvénient pour la reproductibilité des résultats de biodétection car les fluctuations du débit pourraient influencer l'interaction cible/sonde. Il serait donc pertinent d'évaluer l'effet de ce reflux sur les performances du biocapteur et de comparer ces résultats à ceux obtenus avec un actionnement en flux continu, présentés dans le chapitre IV. Une nouvelle architecture de la petite pompe pourrait également être envisagée avec l'intégration de deux vannes pneumatiques entourant la chambre microfluidique. L'influence de cette architecture sur le phénomène de reflux pourrait être évaluée dans l'objectif de réduire son effet.

Lors des tests fluidiques, nous avons pu constater que la grosse pompe est capable de purger l'air présent dans la cartouche et d'injecter du liquide dans les canaux. En revanche, la petite pompe ne permet pas d'initier le déplacement du fluide lorsque la cartouche n'est pas préalablement préremplie. La grosse pompe semble également introduire des bulles d'air dans les canaux, quel que soit le tempo sélectionné. Ce phénomène pose un problème car dans un protocole de biodétection, la présence de bulles d'air dans les canaux peut perturber le flux, gêner le contact avec les cibles d'intérêt et ainsi fausser les mesures.

Pour caractériser plus précisément ces micro-pompes, un test préliminaire utilisant des microbilles de polystyrène fluorescentes a été mis en place (Annexe H). Cependant la vitesse importante des microbilles n'a pas permis l'acquisition de données exploitables. Une analyse plus efficace nécessiterait l'utilisation d'une caméra rapide ou le recours à la technique de PIV (Particle Image Velocimetry). Cette méthode d'imagerie tomographique permet de mesurer les champs de vitesses d'écoulement des fluides à l'aide de particules-traceurs et serait un outil pertinent pour quantifier les phénomènes de reflux observés.

Afin d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux sur les performances du biocapteur, il a été décidé de travailler avec l'actionnement en flux continu, notamment pour étudier l'influence du débit sur les résultats. Même si cet actionnement peut être instable à faibles débits (< 50 µL/min), il permet d'injecter les liquides en continu et sans introduire de bulles d'air, contrairement à l'actionnement avec la micro-pompe. Cette étude est présentée dans le chapitre IV.

III.3 Caractérisation et validation du module optique

Cette seconde partie du chapitre se concentre sur la caractérisation optique du dispositif optofluidique. Plus précisément, elle porte d'abord sur la caractérisation de l'uniformité d'illumination du banc optique, puis sur la détection des plots fluorescents du biocapteur au sein de la cartouche microfluidique, et finalement sur l'optimisation de cette dernière pour améliorer la détection des plots fluorescents, en modifiant sa conception et les matériaux utilisés.

III.3.1 Validation de l'illumination du banc optique

La stabilité et l'uniformité de l'illumination du système optique sont primordiales afin de comparer les résultats entre les différentes zones de capture et les différents canaux fluidiques. L'uniformité de l'éclairement peut être évaluée à partir du coefficient de variation de l'intensité lumineuse. Pour ce projet, nous considérons qu'un CV inférieur à 5 % indique une très bonne homogénéité du système, tandis qu'un CV entre 5 % et 10 % reste acceptable. Pour vérifier que le module optique remplit bien son cahier des charges, plusieurs tests ont été effectués.

i. Test de la reproductibilité de l'illumination de la LED

Dans un premier temps, la reproductibilité de l'éclairement de la LED a été étudiée à l'aide d'une photodiode (S121C, Thorlabs), positionnée au niveau de la zone de détection du banc microfluidique. Lors d'un protocole d'immunodétection, l'acquisition d'une image est réalisée selon la séquence suivante : la LED est allumée pour illuminer le biocapteur, sur un temps égal au temps d'intégration de la mesure, puis l'image détectée par la caméra est enregistrée avant extinction de la LED. Pour ce projet, nous avons fait le choix de ne pas laisser la LED allumée en continu. Même si plusieurs images sont acquises à la suite, la LED est tout de même éteinte entre deux acquisitions. Ce choix a été fait pour éviter le photoblanchiment des fluorophores, pour ne pas endommager la caméra et pour des raisons de sécurité. Si la LED est allumée en continu, le capot ne peut pas être retiré. Or celui-ci est retiré à plusieurs reprises au cours d'un protocole d'immunodétection pour remplir les réservoirs de PBS 1X ou d'autres échantillons. Généralement lors de l'acquisition d'un résultat, plusieurs images sont enregistrées pour différents temps d'intégration.

Pour ce test, trois cycles d'acquisition comprenant 16 séquences ont été réalisés, avec une modification du temps d'intégration pendant l'acquisition des images : 500 ms pour les 10 premières images, puis 1000, 1300, 1500, 2000, 4000 et 6000 ms pour les suivantes.

La Figure III.26 montre que, pour un temps d'intégration de 500 ms, la puissance de la LED n'atteint pas le même niveau pour toutes les acquisitions. En effet, lors du premier cycle, plusieurs séquences n'atteignent pas la puissance maximale (6,5 mW), avec une diminution de puissance allant jusqu'à 21 % (5,1 mW) pour l'une des séquences, tandis que pour le second cycle et le troisième cycle, une fluctuation de puissance pouvant atteindre 17 % est observée. Pour ce temps d'intégration, le CV de l'ensemble des valeurs est de 7 %, ce qui reste acceptable en termes de reproductibilité. Cependant, certaines images prises avec un temps d'intégration

de 500 ms pourront tout de même présenter de faibles variations de fluorescence directement liées aux fluctuations de la puissance de la LED. Ce résultat s'explique probablement par le fait que la LED n'a pas le temps de se stabiliser avant l'acquisition rapide de l'image. Pour les temps d'intégration plus longs, la puissance de la LED est très reproductible.

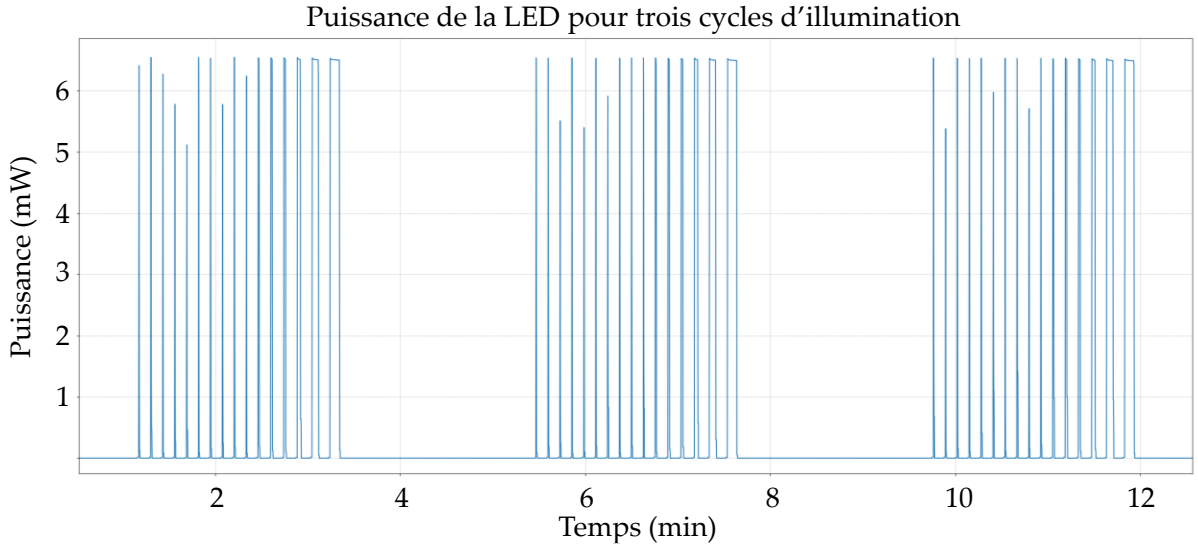


Figure III.26 : Graphique représentant l'évolution de la puissance de la LED pour 3 cycles de 16 séquences : les 10 premières séquences ont un temps d'intégration de 500 ms suivi de 1000, 1300, 1500, 2000, 4000 et 6000 ms.

ii. Tests de l'uniformité de l'illumination avec une lame autofluorescente non calibrée

Pour évaluer l'uniformité de l'illumination, une lame autofluorescente (Chroma Technology Corp, USA) a été placée sur une cartouche microfluidique sans fenêtre et a été illuminée par le module optique avec les paramètres suivants : ampérage 100 mA, gain 50 et temps d'intégration 10 ms (Figure III.27.A). Les images de fluorescence obtenues ont été analysées grâce au logiciel de traitement et d'analyse d'images Fiji.

L'intensité de fluorescence a été mesurée sur l'image dans une zone délimitée par un rectangle jaune représenté sur la Figure III.27.B. Les dimensions réelles de ce rectangle sont d'environ 15 mm x 6 mm. La caméra utilisée pour le banc optique est une caméra 8 bits, ce qui signifie que les intensités lumineuses détectées sont comprises entre 0 et 255 niveaux de gris (unité arbitraire, U.A). Ici, la moyenne d'intensité mesurée est de 168,61 U.A, avec un écart-type de 2,79 et un CV de 1,66 %.

L'examen des fluctuations d'intensité sur toute la surface considérée (Figure III.27.C) met donc en évidence une très bonne uniformité avec la présence ponctuelle de pics correspondant à des zones localement plus lumineuses (Figure III.27.C). La lame Chroma n'étant pas considérée comme une lame calibrée, une seconde lame est utilisée dans la section suivante pour caractériser le banc optique et confirmer les premiers résultats.

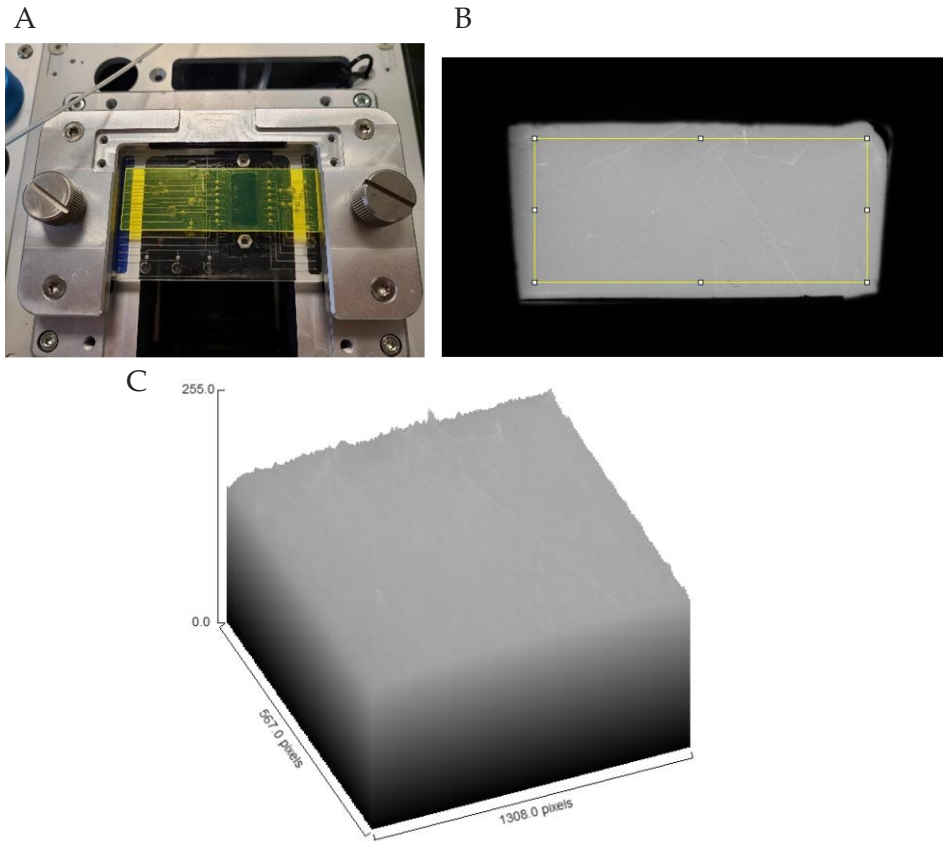


Figure III.27 : A - Lame Chroma déposée sur la cartouche microfluidique, B - Visualisation de la lame dans la zone de détection de la cartouche microfluidique avec un rectangle jaune tracé dans la zone de détection pour l'analyse de l'uniformité de l'illumination, C - Résultats de la répartition de l'intensité lumineuse (niveau de gris) dans cette zone.

iii. Test avec une lame de calibration de microscope

Les lames ArgoLight sont des lames d'étalonnage pour microscope de fluorescence. La lame utilisée, Argo-POWER^{LM} Slide V2 (ArgoLight, France), est composée d'une grille de 16 carrés de 100 µm de côté, présentant des intensités de fluorescence suivant une évolution linéaire. À l'intérieur de chaque carré sont représentés des serpentins. Le banc optique n'étant pas un microscope, la visualisation de ce motif est moins précise, formant seulement des carrés pixélisés (Figure III.28.B et C).

Cette lame ArgoLight a été déplacée sur toute la zone de détection et l'acquisition des images a été réalisée via le banc optique. Au total, 9 régions ont été analysées, représentées sur la Figure III.28.D. Les paramètres de puissance (1000 mA) et de gain (100 %) pour ce test n'ont pas été modifiés. Seul le paramètre de temps d'intégration a varié pendant l'expérimentation avec comme valeurs : 100 ms, 500 ms, 800 ms, 1000 ms pour étudier son effet sur la stabilité du système. Le temps d'intégration correspond au temps pendant lequel le capteur de la caméra est exposé à la lumière, permettant l'accumulation de photons et donc l'augmentation du signal de fluorescence. Jouer sur ce paramètre devrait permettre d'augmenter la sensibilité et de détecter des signaux de fluorescence plus faibles. Dix images ont donc été acquises pour chaque temps d'intégration et pour chaque région de la lame analysée et ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji.

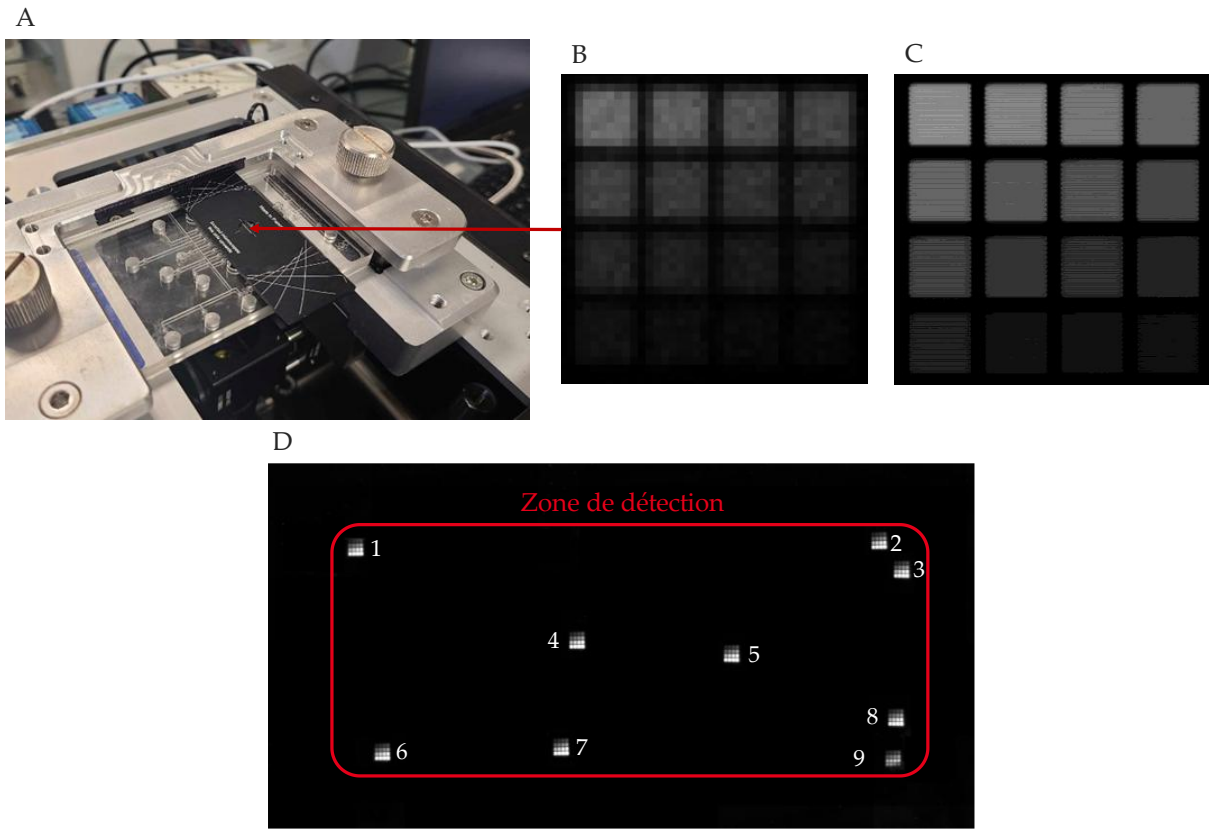


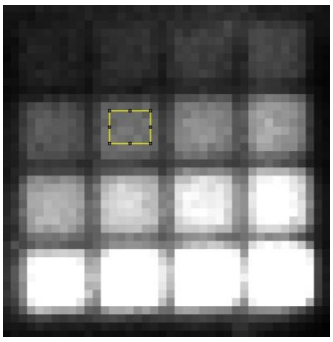
Figure III.28 : A- Lame ArgoLight positionnée sur la cartouche dans la zone de détection, B- Visualisation des motifs serpentins pixelisés avec le banc optique, C- Visualisation des motifs serpentins nets avec un microscope, D - Positionnement des 9 régions analysées avec la lame Argolight.

- Étude de la stabilité du système optique

Tout d'abord, la stabilité du système optique doit être étudiée pour être sûr qu'il n'y ait pas de variations intrinsèques qui puissent influencer les résultats de fluorescence. Prenons par exemple la région n° 4 située au centre de la zone de détection (Figure III.28.D). Une analyse de cette région est réalisée sur 10 images acquises successivement à 10 s d'intervalle, et pour quatre temps d'intégration différents : 100, 500, 800 et 1000 ms. Pour chaque image, l'intensité moyenne de fluorescence, d'un des 16 carrés calibrés de la lame Argolight, est analysée à l'aide du logiciel Fiji. Pour comparer les différents temps d'intégration, nous avons sélectionné un carré au centre de la grille qui ne sature pas pour les temps d'intégration élevés. La zone analysée sur chaque image est un rectangle de 5 x 4 pixels (Figure III.29.A).

À partir d'un graphique en boîte à moustaches (Figure III.29.B). Une faible variation de la fluorescence est observée, quel que soit le temps d'intégration défini, bien que la dispersion des valeurs tende à augmenter avec celui-ci. Cependant, les écarts-types des données de fluorescence, présentés dans le Tableau III-4, montrent que cette variation reste très faible. Les coefficients de variation confirment ce constat en étant tous strictement inférieurs à 5 %. On remarque tout de même que le CV diminue lorsque le temps d'intégration augmente. De plus, les variations d'intensité ne montrent aucune dépendance vis-à-vis de l'ordre d'acquisition des images et sont donc aléatoires. Tous ces résultats sont les mêmes pour les autres régions.

A



B Fluorescences moyennes en fonction du temps d'intégration pour la zone n°4

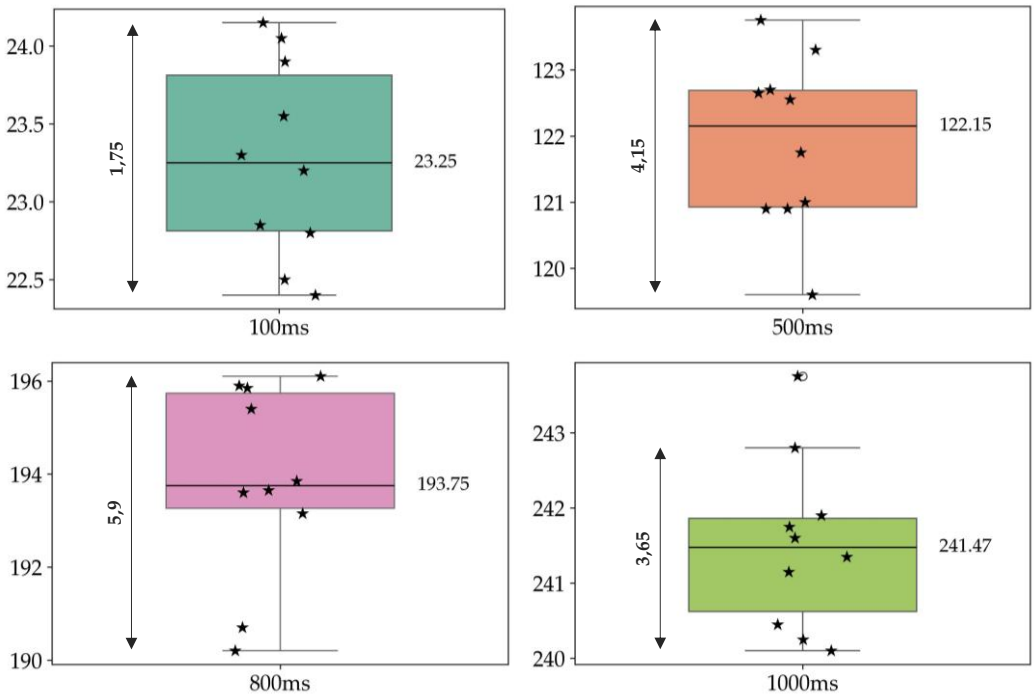


Figure III.29 : A- Région analysée sur la lame Argolight avec le logiciel Fiji, B - Résultats d'analyse de la fluorescence moyenne des 10 images prises pour un même temps d'intégration (100 ms, 500 ms, 800 ms et 1000 ms), pour la région n° 4.

Temps d'intégration (ms)	Médiane	Moyenne	Écart-type	Coefficient de variation (%)
100	23,25	23,27	0,63	2,72
500	122,15	121,91	1,30	1,06
800	193,75	193,84	2,10	1,08
1000	241,47	241,51	1,14	0,47

Tableau III-4 : Les résultats des médianes, moyennes, écarts-types et de coefficients de variation sont représentés pour chaque temps d'intégration pour la région n° 4.

Avec la lame Argolight, il n'est pas possible d'étudier des temps d'intégration trop élevés car la grille calibrée sature. Cependant le test a également été réalisé pour un temps d'intégration de 2000 ms dans la région n° 4 mais à partir du deuxième carré en haut à gauche.

L'intensité de fluorescence moyenne sur 10 acquisitions est de 207,33 U.A avec un écart-type de 1,39 et un CV de 0,67 %, ce qui confirme que l'acquisition d'images avec des temps d'intégration élevés semble stable.

- Étude de l'uniformité de l'illumination dans la zone de détection

La variation de fluorescence dans les différentes régions de la zone de détection a également été étudiée. La Figure III.30-A présente les boîtes à moustaches pour les 9 régions analysées (Figure III.28.D) et pour chaque temps d'intégration, ainsi que pour l'ensemble des données de la zone de détection pour chaque temps d'intégration.

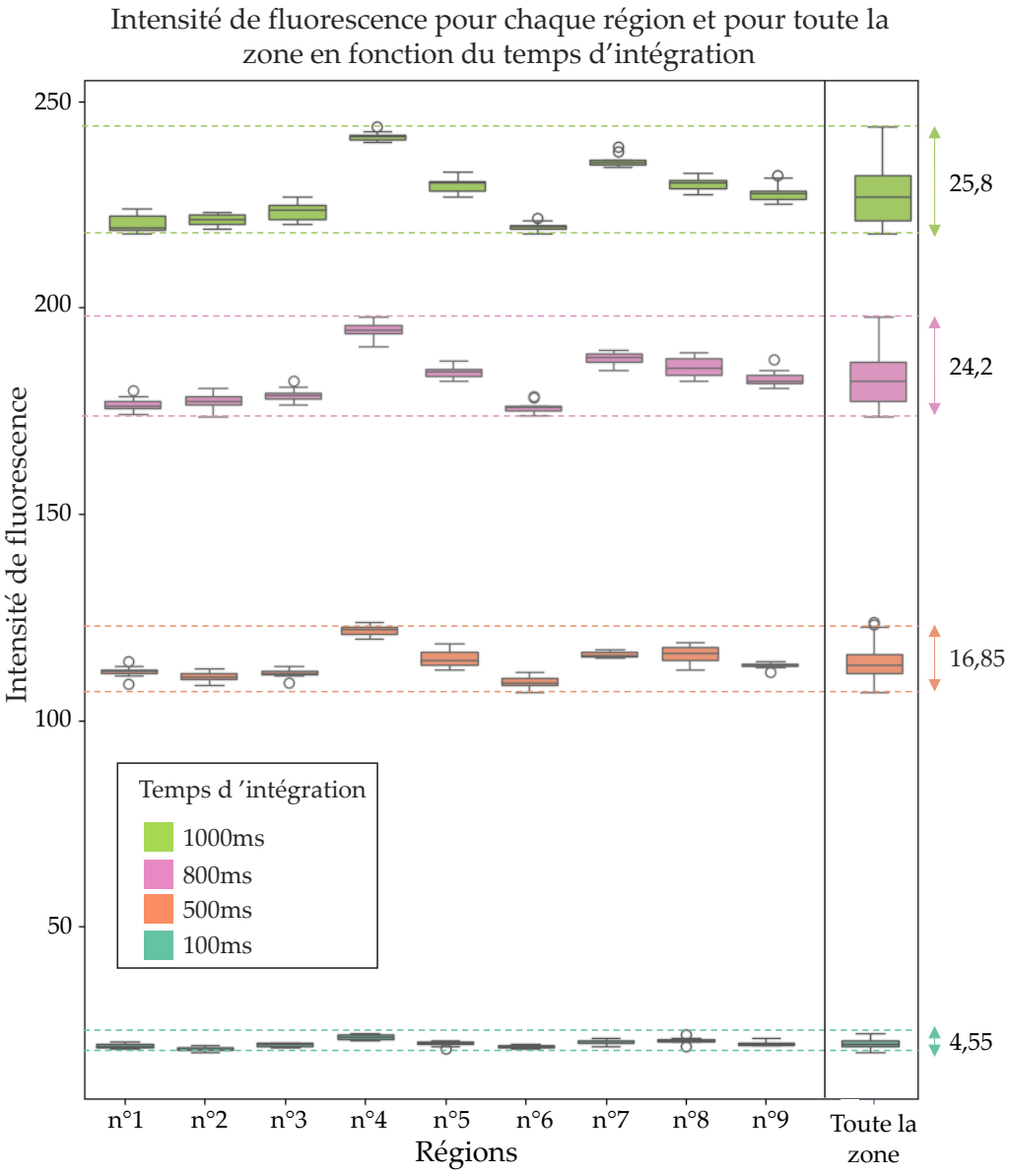


Figure III.30 : Intensité de fluorescence pour chaque région et pour toute la zone de détection en fonction du temps d'intégration.

Si l'on prend en compte toutes les données des régions ensemble, nous pouvons voir que, quel que soit le temps d'intégration, les régions les plus lumineuses sont les n° 4, 5, 7 et 9 (au centre et en bas à droite) et les régions les moins lumineuses sont les n° 1, 2, 3 et 6 (sur les

côtés à gauche et en haut à droite). Plus le temps d'intégration augmente et plus les valeurs se dispersent. Ceci est confirmé par les valeurs d'écarts-types calculées pour l'ensemble de la zone de détection et qui augmentent pour des temps d'intégration plus élevés (Tableau III-5). Cependant les coefficients de variation, calculés sur toute la zone de détection et pour chaque temps d'intégration, sont plus faibles pour des temps d'intégration plus élevés. Dans tous les cas, les CV restent inférieurs à 5 %, ce qui indique que les hétérogénéités d'illumination sont négligeables.

Temps d'intégration (ms)	100	500	800	1000
Médiane	21,70	113,5	183,15	227,9
Moyenne	21,75	114,23	183,32	228,53
Ecart-type	0,97	3,99	6,04	7,14
Coefficient de variation (%)	4,44	3,49	3,30	3,13

Tableau III-5 : Valeurs des médianes, moyennes, écarts-type et coefficients de variation pour la zone de détection complète et pour chaque temps d'intégration.

iv. Discussion

La première caractérisation de la LED a montré que pour de faibles temps d'intégration et avec notre méthode d'acquisition des images, qui consiste à allumer la LED juste avant une acquisition puis à l'éteindre après, la puissance de la LED n'est pas stable avec une diminution de puissance qui peut aller jusqu'à 21 %. Bien que le coefficient de variation soit de 7 %, cette fluctuation peut avoir une influence sur les résultats de fluorescence. Cependant, grâce à la méthode de normalisation, présentée dans le chapitre II, cette fluctuation sera effacée avec la mise à niveau de la fluorescence par rapport à une référence de fluorescence stable.

En ce qui concerne l'uniformité de l'illumination, celle-ci est satisfaisante dans la zone de détection. Les variations d'intensité mesurées restent faibles, avec des coefficients de variation inférieurs à 5 % pour des temps d'intégration entre 100 ms et 2000 ms, confirmant la fiabilité du système pour les applications de biodétection. Il n'a pas été possible d'étudier des temps d'intégration plus élevés car après 2000 ms d'intégration, la grille de carrés calibrée sature.

III.3.2 Caractérisation et validation de l'intégration du biocapteur dans la cartouche microfluidique pour la mesure de fluorescence

À la suite de la validation fluidique de la cartouche microfluidique et du banc optique pour la détection de fluorescence en champ large, des tests sont réalisés afin d'évaluer la compatibilité de la cartouche avec la détection par fluorescence.

i. Détection des plots fluorescents sans cartouche microfluidique

L'objectif est de vérifier que le banc optique permet de visualiser la capture des cibles sur le biocapteur seul, puis intégré dans la cartouche microfluidique. Le test a été réalisé à partir d'un biocapteur fonctionnalisé par voie gazeuse avec des anticorps lapin comme biorécepteurs (chapitre II). Il consiste à déposer une goutte d'échantillon contenant les anticorps anti-lapin fluorescents sur la zone de détection et à laisser l'ensemble incuber. Le protocole est détaillé en Annexe I.

Le biocapteur est analysé par le banc optique avec les paramètres suivants : la source lumineuse a été réglée à sa puissance maximale avec un ampérage de 1000 mA, de même pour le gain à 100 % et le temps d'intégration est fixé à 750 ms. L'image obtenue est présentée sur la Figure III.31. Les niveaux de fluorescence sont analysés à l'aide du programme de segmentation présenté dans le chapitre II. En moyenne, l'intensité de fluorescence brute des plots est de 157,0 U.A et le bruit de fond local moyen est de 3,8 U.A. Un bruit de fond local faible est essentiel pour s'assurer d'une discrimination fiable entre le signal mesuré et le bruit.

Le rapport signal sur bruit (S/B) constitue un indicateur clé de la qualité de détection. Selon le Conseil international d'harmonisation des exigences techniques applicables aux produits pharmaceutiques à usage humain (ICH), le rapport signal sur bruit (S/B) se calcule en comparant les signaux mesurés sur des échantillons dont la concentration en analyte est connue avec les signaux d'échantillons témoins sans analyte. Mais il est également possible d'utiliser les signaux provenant d'une zone de référence appropriée à la place des échantillons témoins. D'après l'ICH, un rapport signal sur bruit de 3 est considéré comme acceptable si l'on souhaite estimer la limite de détection (LOD) d'un système, tandis qu'un rapport d'environ 10 est requis pour déterminer la limite de quantification (LOQ) [163].

Pour l'analyse du biocapteur, le bruit de fond local des plots est utilisé comme zone de référence pour le bruit. Le rapport signal sur bruit, calculé pour chaque plot, est en moyenne de 44 : 1. Ces résultats indiquent que le banc optique est bien adapté à la détection des plots fluorescents avec une bonne sensibilité.

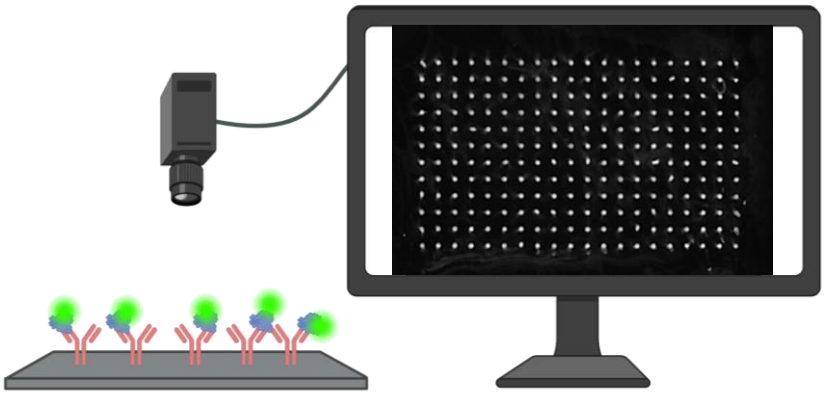


Figure III.31 : Visualisation des zones de fluorescence sans cartouche microfluidique avec le banc optique et les paramètres d'acquisition suivants : intensité de la LED à 1000 mA, gain à 100 %, temps d'intégration 750 ms.

ii. Détection des plots fluorescents dans la cartouche microfluidique

Dans un second temps, le même biocapteur contenant les plots fluorescents a été placé dans la cartouche microfluidique pour vérifier la compatibilité de la détection à travers l'empilement COC/membrane/COC (Figure III.32.A). En conservant les mêmes paramètres optiques que précédemment, il apparait que le signal dans la zone de détection est complètement saturé avec une valeur maximale de 255 U.A (Figure III.32 B).

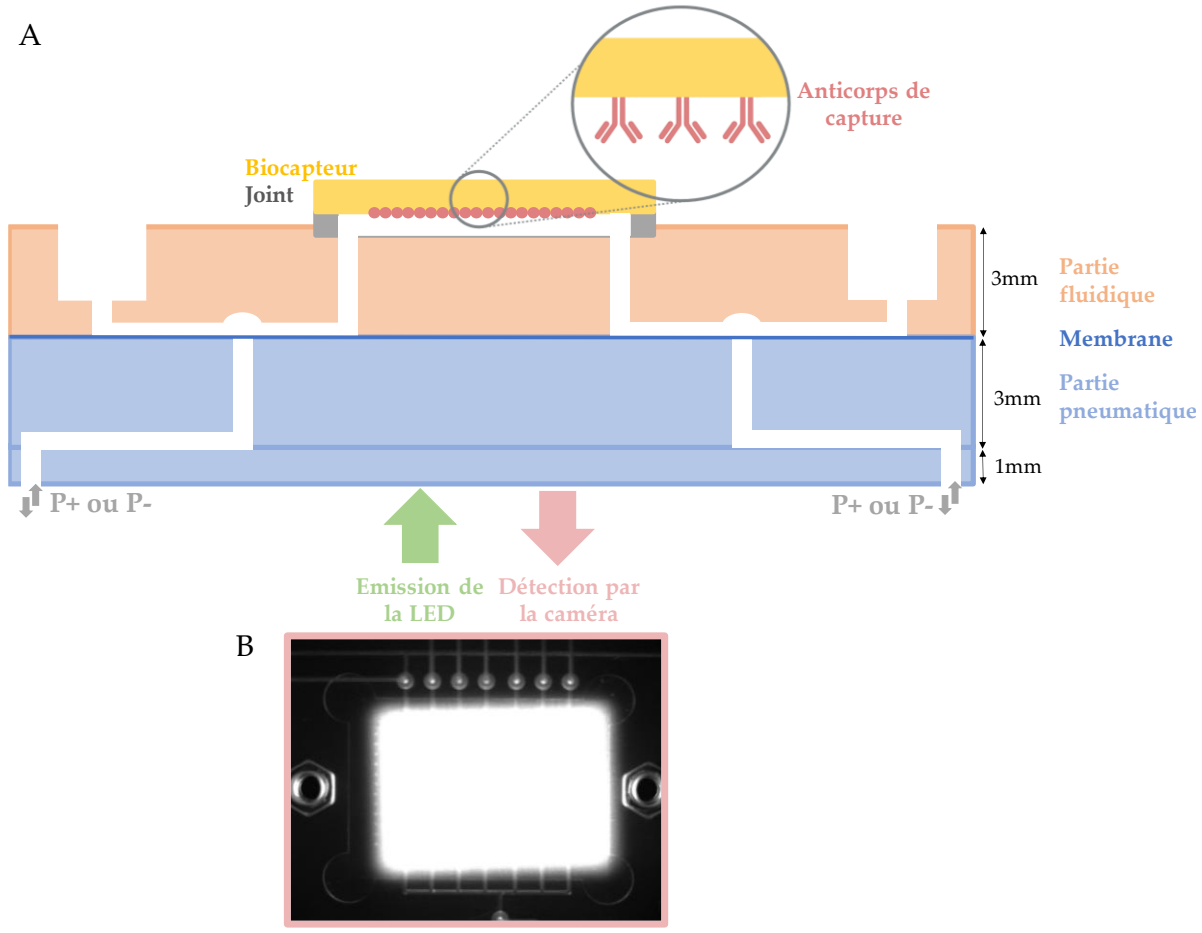


Figure III.32 : (A) Vue de côté de l'assemblage complet de la cartouche (B) Résultat de la visualisation du résultat via le module optique avec les paramètres d'acquisition suivants : intensité de la LED à 1000 mA, gain à 100 % et temps d'intégration à 750 ms.

Le COC et/ou la membrane élastique introduisent donc de la lumière parasite. Ce problème n'avait jamais été soulevé auparavant car les temps d'intégration utilisés pour d'autres projets étaient très faibles (environ 20 ms) comparés à ceux utilisés dans cette étude (> 500 ms). Dans notre cas, il est pourtant nécessaire de travailler avec des temps d'intégration élevés pour réussir à capter les signaux de fluorescence des plots de détection qui font environ 250 µm de diamètre.

Afin d'identifier la source du problème, une couche de 3 mm de COC et la membrane élastique ont été imagées avec le banc optique, en utilisant les mêmes paramètres que précédemment. Les résultats indiquent clairement que la membrane élastique est responsable de la saturation du signal (Figure III.33). La membrane élastique étant essentielle pour la

technologie pneumatique, il est impossible de la supprimer totalement, ni de changer le type de membrane. La cartouche microfluidique doit donc être modifiée.

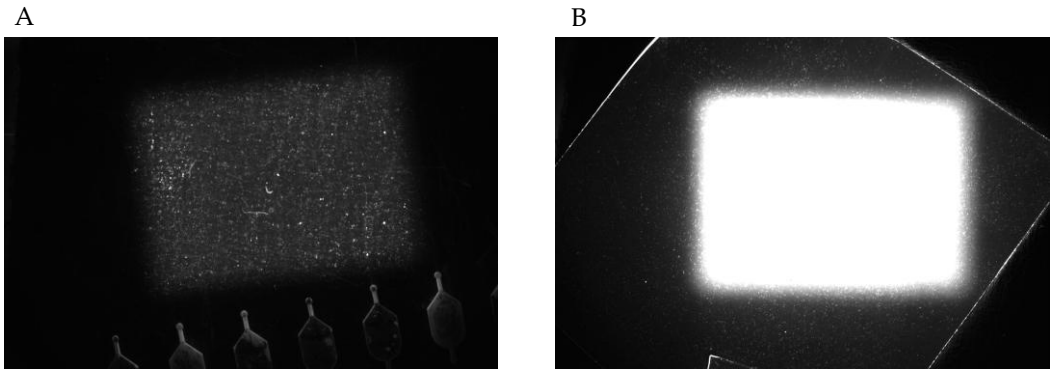


Figure III.33 : (A) Résultat de l'illumination de 3 mm de COC, (B) Résultat de l'illumination de la membrane élastique avec les paramètres d'acquisition suivants : intensité de la LED à 1000 mA, gain à 100 % et temps d'intégration à 750 ms.

iii. Optimisation de l'assemblage de la cartouche en COC

Pour dépasser cette limitation, l'assemblage des cartouches microfluidiques a été modifié en retirant la membrane élastique dans la zone d'observation. La membrane étant à l'interface entre les deux niveaux fluidiques et pneumatiques en COC, celle-ci ainsi que la partie pneumatique ont été découpées au niveau de la zone de détection pour ne laisser que la couche de COC fluidique de 2,4 mm entre le capteur et le module optique (Figure III.34-A). Cette fenêtre d'observation a pour dimensions 21,5 mm x 10 mm. Dans cette configuration, l'analyse de la fluorescence montre que le signal dans la zone de détection où la membrane a été découpée n'est plus saturé et que les plots de fluorescence sont visibles. Cependant, malgré le retrait de la membrane dans la zone de détection, celle-ci reste entourée de signaux totalement saturés à cause de la présence de la membrane élastique tout autour. (Figure III.34.B).

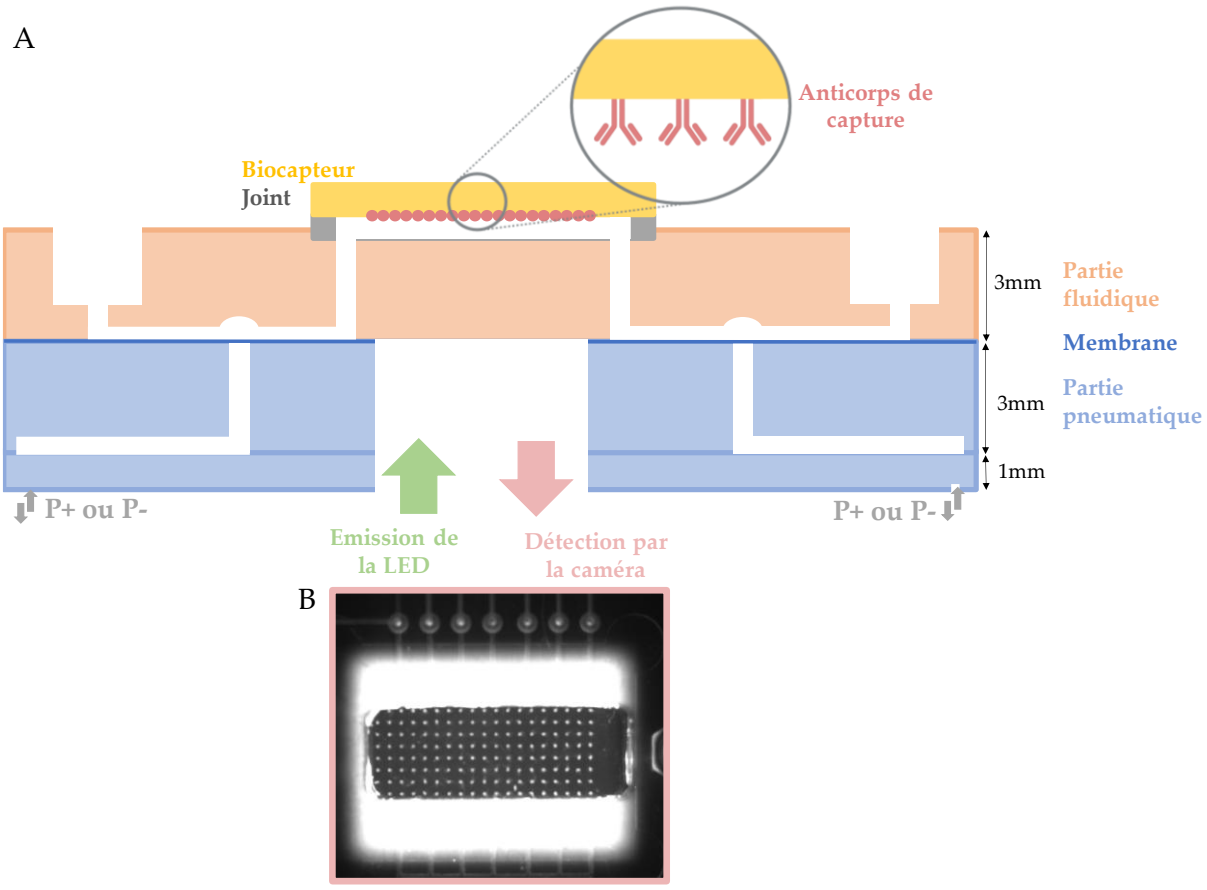


Figure III.34 : (A) Vue de côté de l'assemblage modifié de la cartouche (B) Visualisation du résultat après modification.

Malheureusement la membrane élastique ne peut être retirée au-delà de la zone de détection à cause de vannes pneumatiques et au risque de causer des fuites. Alors pour éviter que cette saturation du signal n'affecte les résultats de fluorescence, un adhésif noir (Advance Tapes) a été positionné autour de la zone de détection (Figure III.35). La Figure III.35-A met en évidence l'absence de saturation de l'image avec l'ajout de l'adhésif.

Dans cette configuration, l'intensité de fluorescence moyenne brute est de 169,3 U.A et le bruit de fond local moyen est de 51,9 U.A. Les signaux de fluorescence des plots ont donc augmenté ainsi que le bruit de fond, ce qui nous donne un rapport signal sur bruit de 3,3. L'augmentation du bruit de fond entraîne une diminution du rapport S/B. Cette augmentation est due à la couche de 2,4 mm de COC entre le biocapteur et le banc optique qui détériore la sensibilité de la détection. Si l'on se place dans les futures conditions expérimentales en ajoutant le joint en silicone, on remarque que le joint n'apporte pas de signaux parasites (Figure III.35-B). Un marqueur noir (Sharpie Permanent Marker) a également été appliqué par la suite sur l'adhésif, pour réduire encore plus le bruit autour de la zone de détection.

Cette modification d'architecture a permis d'effectuer les premiers tests de biodétection sur la plateforme optofluidique, cependant elle n'est pas optimale.

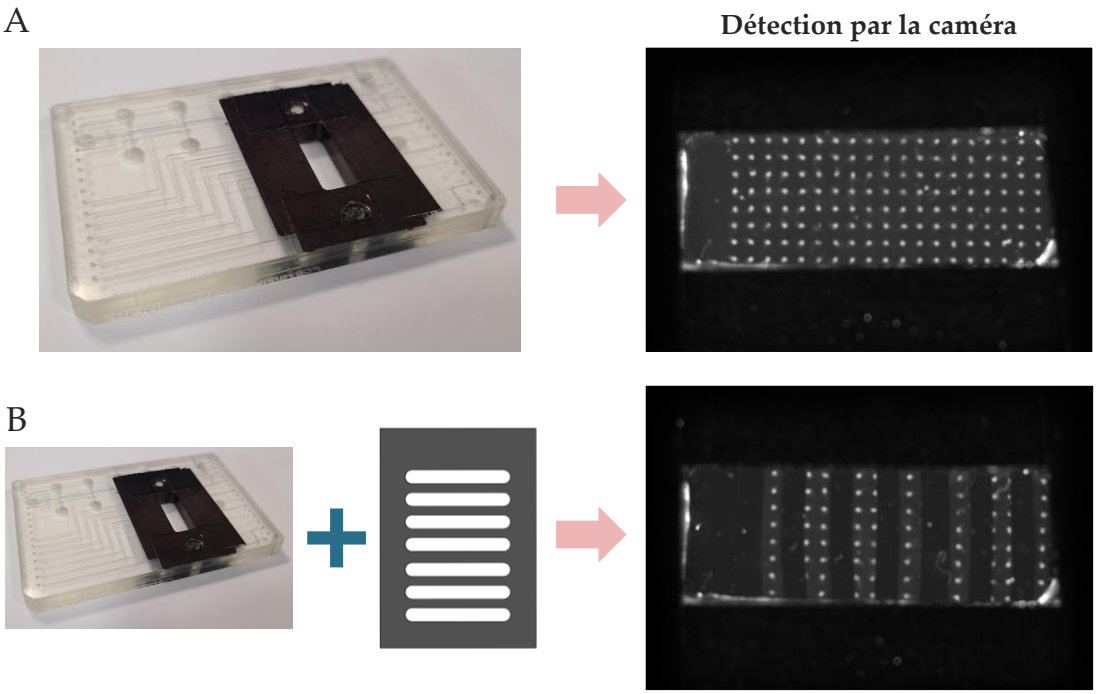


Figure III.35 : A- Cartouche microfluidique avec l'adhésif noir entourant la zone de détection avec la visualisation des signaux fluorescents dans ces conditions, B- Cartouche microfluidique avec l'adhésif noir et le joint en silicone avec la visualisation des signaux fluorescents dans ces conditions.

iv. Limitations du COC

À des temps d'intégration élevés (> 100 ms), le COC émet un signal lumineux parasite qui a pour conséquence d'augmenter le bruit de fond, bien qu'il soit connu pour être optiquement très bon. Pourtant le temps d'intégration est un paramètre essentiel pour améliorer la sensibilité du système. Les effets de celui-ci sur le bruit de fond du système ont donc été étudiés. Pour cela, deux cartouches microfluidiques ont été étudiées. La première est composée de 2,4 mm de COC entre le module optique et le biocapteur et la deuxième de 1 mm de COC. L'intensité du bruit de fond a été mesurée pour différents temps d'intégration du signal. Les résultats pour 2,4 mm de COC montrent qu'à partir de 1000 ms de temps d'intégration, le bruit de fond est supérieur à 69 U.A d'intensité lumineuse et que la saturation du signal est atteinte pour 4000 ms d'intégration (Figure III.36.A). Avec 1 mm de COC, le bruit de fond diminue mais reste tout de même important avec une valeur de 83,65 pour 2000 ms d'intégration et une saturation à partir de 6000 ms. Pendant les expérimentations d'immunocapture avec la cartouche de 2,4 mm, ce bruit de fond a été un point bloquant pour détecter de faibles concentrations, car elles nécessitent des temps d'intégration élevés (> 4000 ms) pour les détecter. Ce bruit de fond exerce donc une influence directe sur la limite de détection de la plateforme [164]. Une nouvelle solution a donc été de remplacer la fenêtre d'analyse en COC par une fenêtre en verre, matériau ayant les meilleures propriétés optiques.

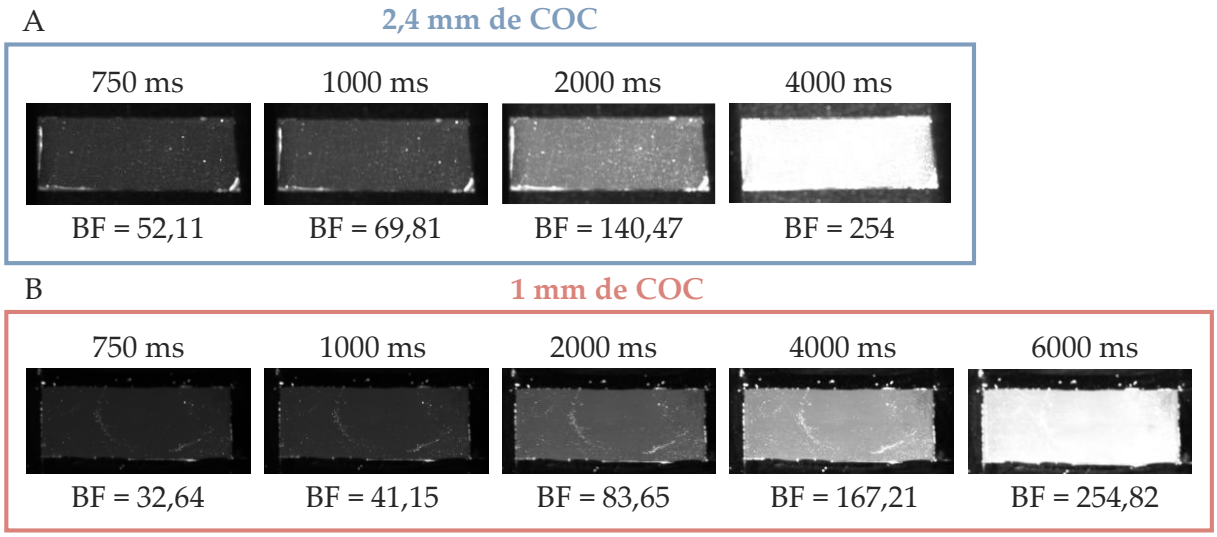


Figure III.36 : Intensité du bruit de fond (BF) mesurée pour des épaisseurs de COC de (A) 2,4 mm de COC et (B) 1 mm de COC, pour différents temps d'intégration.

v. Intégration hétérogène d'une fenêtre en verre

L'intégration de verre dans la cartouche microfluidique est un enjeu supplémentaire car cela rajoute des difficultés de fabrication. En effet, supprimer totalement le COC sous la zone de détection signifie qu'il faut ajouter une fenêtre en verre dans l'empilement. Pour cela, il est nécessaire de découper cette fenêtre en verre pour que le fluide passe à travers et s'injecte dans les canaux du joint structuré sans que celui-ci ne fuie en dehors de la cartouche. Nous avons donc fait appel à la plateforme technologique de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG) pour fournir des pièces en verre de 1 mm percées grâce à leur graveuse laser Axxys Laser C180 qui peut percer le verre jusqu'à 100 µm de diamètre. On rappelle que l'empilement précédent était composé du joint structuré, du capteur et de la contre-bride. Cette fois, on ajoute à l'empilement une fenêtre en verre directement collée à la cartouche grâce à un adhésif (Figure III.37).

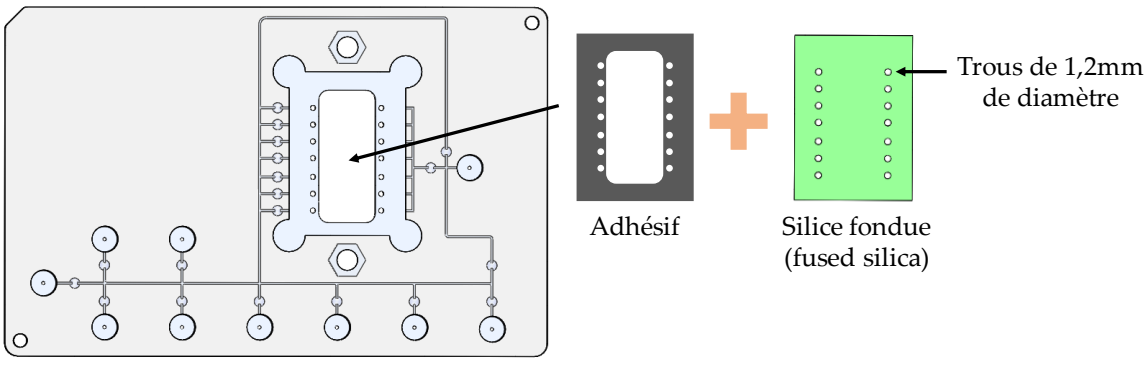


Figure III.37 : Modification de la cartouche microfluidique : suppression du COC sous le capteur et ajout d'un adhésif pour coller la fenêtre de verre.

Une comparaison entre les deux empilements a été réalisée en appliquant le même protocole de biocapture que précédemment pour des concentrations d'anticorps cible AF488 de 10 µg/mL et 1 µg/mL. Après l'immunodétection, le biocapteur est placé dans deux

cartouches différentes, l'une ayant une fenêtre en COC de 1 mm dans la zone de détection et l'autre une fenêtre en verre de 1 mm et deux acquisitions d'images sont effectuées à des temps d'intégration de 2 s et 8 s. Les résultats de fluorescence sont présentés sur la Figure III.38 et le rapport S/B moyen pour le canal 5 (10 µg/mL) et le canal 2 (1 µg/mL) sont calculés pour chaque configuration. Pour une concentration de cible de 10 µg/mL (canal 5) et un temps d'intégration de 2 s, le rapport S/B du verre est 4,5 fois plus élevé que pour la fenêtre en COC. Pour une concentration de cible de 1 µg/mL (canal 2) et un temps d'intégration de 2 s, le rapport S/B pour le COC est de 1,09, ce qui signifie que le signal est égal au bruit de fond. En ce qui concerne le temps d'intégration de 8 s, les canaux saturent à 255, le rapport est donc de 1 et les plots de fluorescence ne sont pas visibles. Alors que pour la fenêtre en verre, nous avons un rapport S/B de 2,7 pour 1 µg/mL, légèrement plus élevé qu'à 2 s d'intégration. Dans le canal 5, les plots de 10 µg/mL saturent, ce qui ne permet pas de calculer un rapport S/B. Cependant, le canal a un bruit de fond local moyen de 52 U.A, ce qui reste plus faible que le bruit de fond moyen de 79 U.A pour le COC à un temps d'intégration de 2 s.

L'utilisation d'une fenêtre en verre réduit donc fortement le bruit de fond lorsque l'on augmente le temps d'intégration et permet une amélioration de la qualité du signal, qui se traduit par une meilleure sensibilité du dispositif.

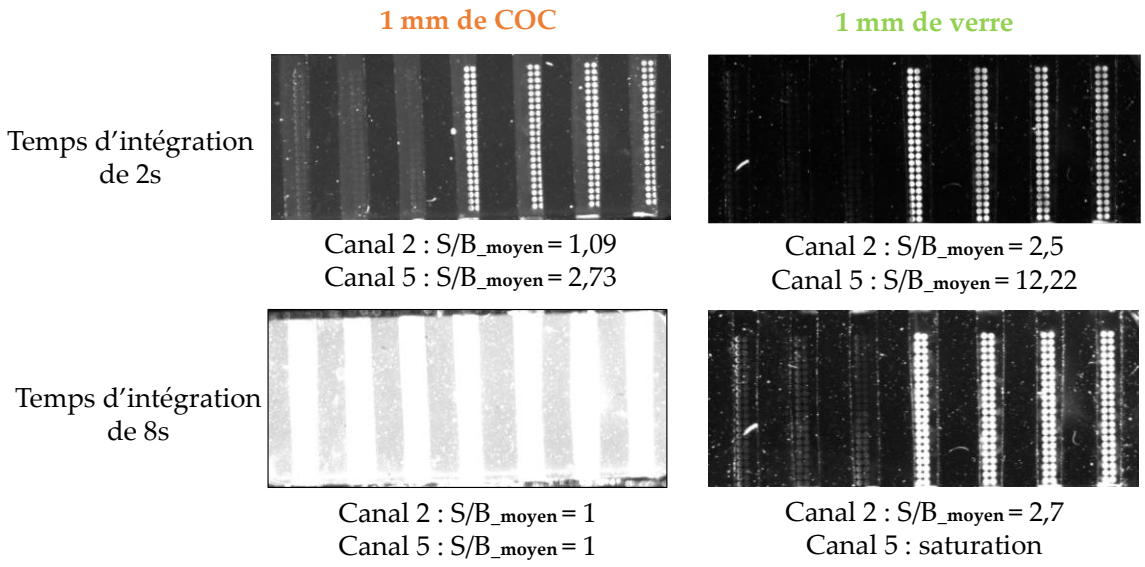


Figure III.38 : Comparaison des valeurs de signal fluorescent sur le bruit de fond pour un même biocapteur avec une fenêtre en COC de 1 mm et une fenêtre de verre de 1 mm. Le joint structuré est placé entre la fenêtre et le biocapteur.

La cartouche microfluidique composée de 2,4 mm de COC dans la zone de détection a été utilisée pour les premiers résultats de biodétection. Une fois mise en place, la cartouche intégrant une fenêtre en verre a été utilisée pendant toute la suite du projet de thèse.

Résumé du Chapitre III

- L'élaboration de la cartouche microfluidique intégrant le biocapteur a été présentée, incluant le choix de la méthode d'intégration amovible ainsi que les tests effectués pour assurer l'étanchéité du système grâce au joint en silicone moulé.

- Les méthodes d'actionnement fluidiques ont été présentées, l'une pour un contrôle continu des liquides et l'autre avec un fonctionnement en cycles péristaltiques.

- La caractérisation fluidique de l'actionnement en flux continu a montré les limites de cet actionnement face à l'apparition de bulles qui peuvent perturber le débit ou le stopper. C'est cet actionnement qui a été utilisé pour développer le protocole de biodétection (chapitre IV).

- La caractérisation fluidique des micro-pompes intégrées dans la cartouche a montré que le rendement réel est inférieur au rendement théorique avec une baisse d'environ 10 % pour la grosse pompe et de 25 % pour la petite pompe. Le rendement augmente cependant avec le tempo. Il a été également observé que les micro-pompe ont une bonne reproductibilité de leur actionnement avec des coefficients de variation inférieurs à 5 %. Pour la grosse pompe, la caractérisation fluidique a montré qu'à un tempo de 0,1 s, cet actionnement introduit des bulles d'air dans le canal de détection.

- Les caractérisations optiques du système optofluidique ont été effectuées. L'étude sur la stabilité de la LED a montré que pour un faible temps d'intégration, la puissance de la LED peut fluctuer avec des différences allant jusqu'à 20 %. L'étude sur l'uniformité de l'illumination du banc optique a confirmé que cette illumination est uniforme avec des coefficients de variation inférieurs à 5 %.

- Dans un second temps, l'étude de la détection de fluorescence au sein de la cartouche microfluidique a mis en évidence la présence de signaux lumineux parasites empêchant la détection des plots fluorescents. Les cartouches ont donc été modifiées pour les rendre compatibles avec la détection par fluorescence, notamment en supprimant la membrane élastique dans la zone de détection, identifiée comme la source principale d'interférences.

- L'intégration d'une fenêtre en verre a été validée pour améliorer la sensibilité du dispositif en réduisant le bruit de fond.

Chapitre IV

Validation et optimisation d'un protocole d'immunodétection sur silicium avec la plateforme optofluidique

Introduction

Le chapitre IV comporte quatre parties. La première se concentre sur le développement du protocole de biodétection avec l'intégration d'un protocole fluidique et des premières validations biologiques. La seconde partie présente les résultats de l'étude sur les paramètres du système pouvant influencer la capture des biomolécules cibles. La troisième partie, quant à elle, est consacrée aux premiers essais de détection d'insuline avec le système optofluidique. Toutes les expérimentations présentées dans ce chapitre ont été réalisées avec des biocapteurs fonctionnalisés à partir de la chimie de surface du CEA Leti.

IV.1 Développement et validation d'un protocole d'immunodétection en microfluidique

Cette partie présente le protocole qui a été intégré dans la cartouche microfluidique pour réaliser une biodétection par fluorescence. La plateforme a ensuite été testée pour étudier la spécificité et la reproductibilité des résultats.

IV.1.1 Étapes préliminaires de préparation de la cartouche microfluidique

i. Passivation de la cartouche microfluidique

Une passivation de la cartouche microfluidique est effectuée occasionnellement pour éviter l'adsorption non spécifique dans les canaux microfluidiques à partir d'une solution de PBS 1X, contenant 3 % d'albumine de sérum bovin (bovine serum albumin, BSA). Cette solution est injectée et incubée dans tous les canaux microfluidiques grâce au protocole suivant : la solution de PBS 1X, 3 % BSA est injectée dans chaque canal sous forme de 5 cycles comprenant 2 min d'injection à 50 µL/min puis 1 min d'incubation. La cartouche est ensuite lavée au PBS 1X. Ce protocole a été adapté à partir de travaux antérieurs.

ii. Optimisation de la gestion fluidique pour réduire l'apparition de bulles d'air

Dans le chapitre précédent, le développement de la cartouche microfluidique a montré sa versatilité pour intégrer plusieurs protocoles automatisés d'injection d'échantillons. Cette gestion fluidique est possible grâce au couplage de vannes pneumatiques à une source d'aspiration. Sur la Figure IV.1 est représentée l'architecture microfluidique avec chaque vanne indépendante numérotée.

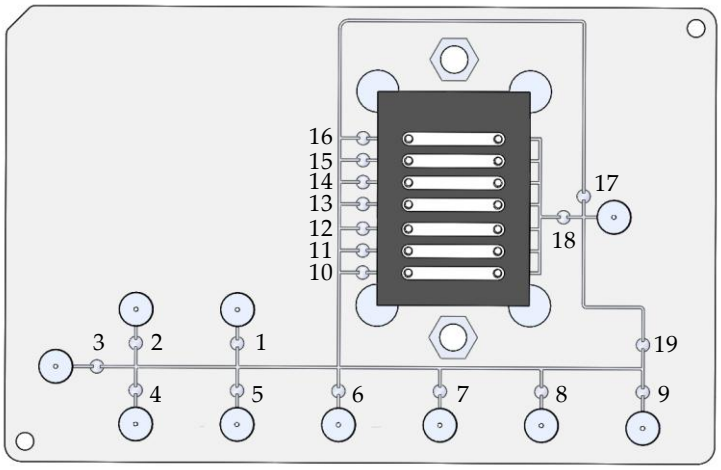


Figure IV.1 : Architecture microfluidique avec les vannes pneumatiques numérotées.

Comme expliqué dans le chapitre III, le paramètre perturbant le plus le flux, avec ce type d'actionnement, est l'apparition de bulles d'air dans le système. Ces bulles peuvent se retrouver coincées dans le tube de sortie relié à la cartouche et ainsi, dans le pire des cas, interrompre complètement le flux. Pour éviter ce problème, deux stratégies ont été mises en place.

La première concerne les séquences d'ouverture et de fermeture des vannes lors de l'injection des fluides dans la cartouche, mais aussi lors de l'arrêt de cette injection. Pour l'injection du fluide, la vanne d'entrée s'ouvre en premier, suivie de la vanne correspondant à l'un des 7 canaux de détection et finalement de la vanne de sortie. C'est en actionnant cette dernière que le fluide commence son déplacement dans la cartouche. Pour interrompre l'injection du fluide, l'ordre de fermeture est inversé : on ferme d'abord la vanne de sortie, ce qui stoppe le flux, puis la vanne du canal de détection et enfin la vanne d'entrée. Cet ordre d'actionnement permet d'éviter l'apparition de bulles dans le système et le tube de sortie.

La deuxième stratégie consiste à purger l'air de la cartouche avant chaque utilisation. Pour cela, la cartouche est entièrement remplie de liquide afin de chasser l'air présent dans le système fluidique et ainsi d'éviter l'apparition de bulles d'air. Cette purge est réalisée en plusieurs étapes : la première consiste à préremplir le tube de sortie à l'aide d'une seringue. Les autres étapes réalisées dans la cartouche sont représentées sur la Figure IV.2 et sont effectuées avec une régulation en pression négative de - 400 mbar. Dans un premier temps, les canaux supérieurs et inférieurs, correspondant aux canaux de purge, sont préremplis avec du PBS 1X (1). Puis c'est au tour des canaux centraux de détection, préremplis les uns après les autres (2). Si plusieurs entrées sont utilisées lors du protocole, celles-ci sont également purgées en passant par le canal inférieur (3). Une fois l'air chassé, le PBS 1X est retiré manuellement des réservoirs d'entrée pour ensuite mettre les échantillons. L'actionnement pneumatique de ces étapes est détaillé en Annexe J.

Ces deux actions ont permis de limiter l'apparition de bulles d'air lors des protocoles d'injection.

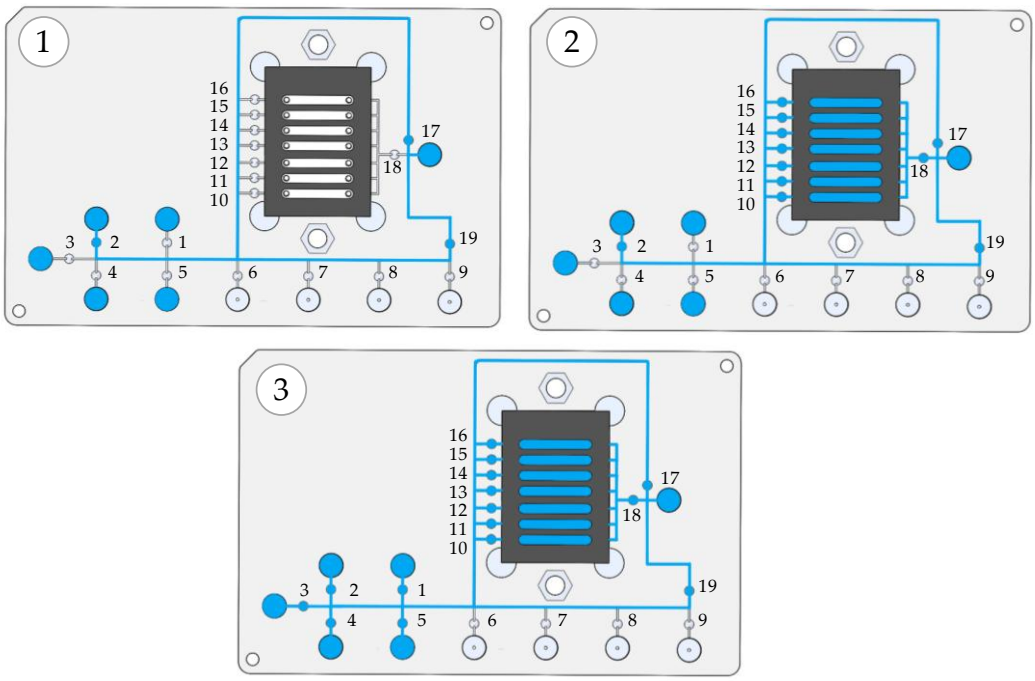


Figure IV.2 : Vue schématique des étapes pour réaliser la purge de l'air présent dans la cartouche, (1) Pré-remplissage des canaux extérieurs appelés canaux de purge via l'entrée n°2, (2) Pré-remplissage séquentiel des 7 canaux de détection, (3) Purge de l'air dans les réservoirs d'entrée en passant par le canal de purge inférieur.

IV.1.2 Intégration du protocole de biodétection

Une fois la cartouche passivée et purgée, celle-ci est prête à être utilisée pour un protocole de biodétection par fluorescence. Les étapes d'un protocole de biodétection pour un canal sont présentées sur la Figure IV.3 et sont décrites ci-dessous :

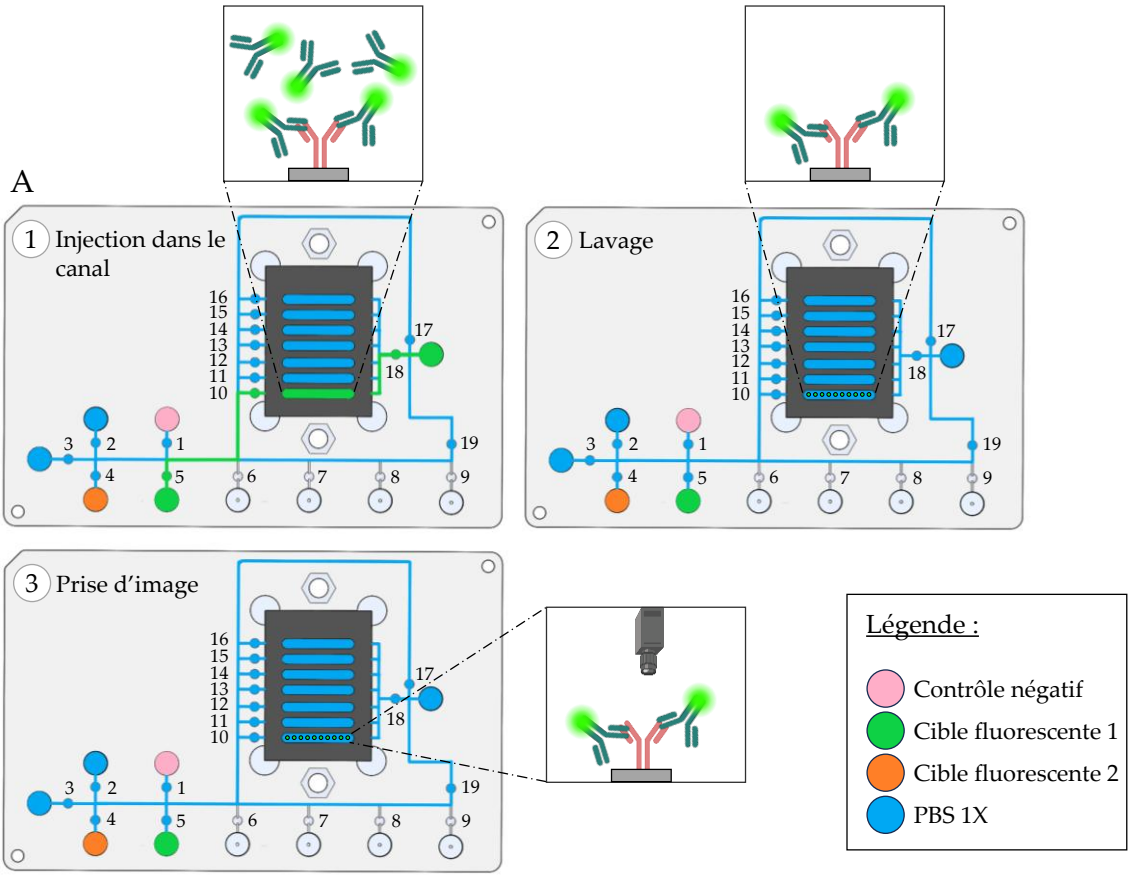
- Étape 1 : injection de l'échantillon contenant les cibles fluorescentes dans l'un des canaux de détection avec une durée et un débit prédéterminés.

- Étape 2 : Lavage du canal avec une solution de PBS 1X pendant 1 min à un débit de 400 µL/min pour s'assurer de l'efficacité du lavage et prévenir l'apparition de bulles d'air dans les canaux de détection (chapitre III).

- Étape 3 : Acquisition d'une image de la zone de détection. Pendant cette prise de vue, du PBS 1X est injecté à un débit de 400 µL/min dans le canal inférieur de purge, pour prévenir la formation de bulles d'air dans le tube de sortie.

- Étape 4 : À la fin du protocole, l'ensemble des canaux de la cartouche sont nettoyés au PBS 1X.

Après son utilisation, la cartouche est nettoyée à l'éthanol puis à l'eau déionisée pour être réutilisée pour un prochain test.



B

	v1	v2	v3	v4	v5	v10	v11	v12	v13	v14	v15	v16	v17	v18	v19
1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Etat vanne :

0	Fermée
1	Ouverte

v1-v5	Vanne connectée à un lueur d'entrée
v10-v16	Vanne connectée à un canal du capteur
v17-19	Vanne connectée à la sortie

Figure IV.3 : A- Étapes du protocole d'injection d'un échantillon dans un des canaux de détection, B- Détails de l'actionnement des vannes pneumatiques.

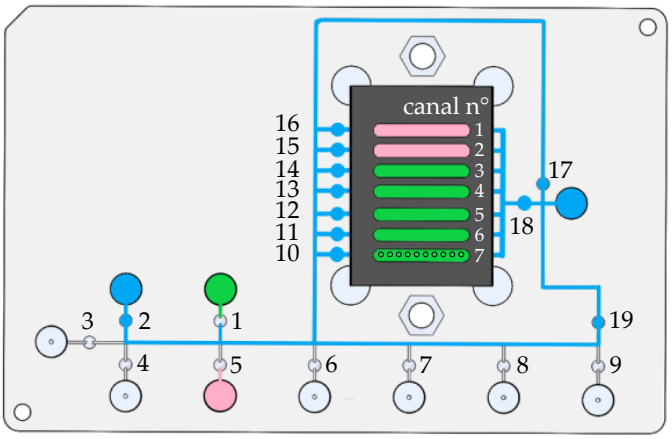
Ces étapes sont ensuite reproduites dans les différents canaux de détection avec d'autres échantillons. Pour réaliser un protocole complet et automatisé, un programme Python a été mis en place et est présenté en Annexe K. Ce programme s'adapte facilement pour réaliser divers protocoles de détection en fonction des besoins des expérimentations.

IV.1.3 Qualification de la plateforme : spécificité et reproductibilité

La qualification de la plateforme consiste à analyser la spécificité du couple d'anticorps sélectionnés et à vérifier la reproductibilité des résultats biologiques entre les différents canaux d'un biocapteur ainsi qu'entre plusieurs biocapteurs. La limite de détection sera évaluée ultérieurement. Ces validations ont été effectuées avec la première cartouche microfluidique mise en place et composée de 2,4 mm de COC dans la zone de détection.

i. Étude de la spécificité de l'immunocapture

Pour évaluer la spécificité de l'immunocapture, des anticorps anti-souris (non spécifiques aux anticorps de capture lapin) ont été injectés dans les canaux 1 et 2 dans les mêmes conditions que les anticorps anti-lapin (Figure IV.4). Ce test a été répété deux fois.



Paramètres :

- Débit : 50 µL/min
- Temps d'injection : 2 min
- Temps d'intégration : 1000 ms

Anticorps Anti-Lapin AF488 : 10µg/mL

PBS 1X

Anticorps Anti-Souris AF488 : 10µg/mL

Figure IV.4 : Illustration de l'expérimentation réalisée avec les paramètres appliqués.

Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence de chacun des plots de détection ont été calculées ainsi que la valeur médiane d'intensité de fluorescence pour chaque canal (Figure IV.5 et Figure IV.6). Pour considérer une réaction comme spécifique, le ratio signal spécifique/signal non spécifique (S/B) doit être supérieur à 3, conformément à ce qui est décrit dans la littérature [163].

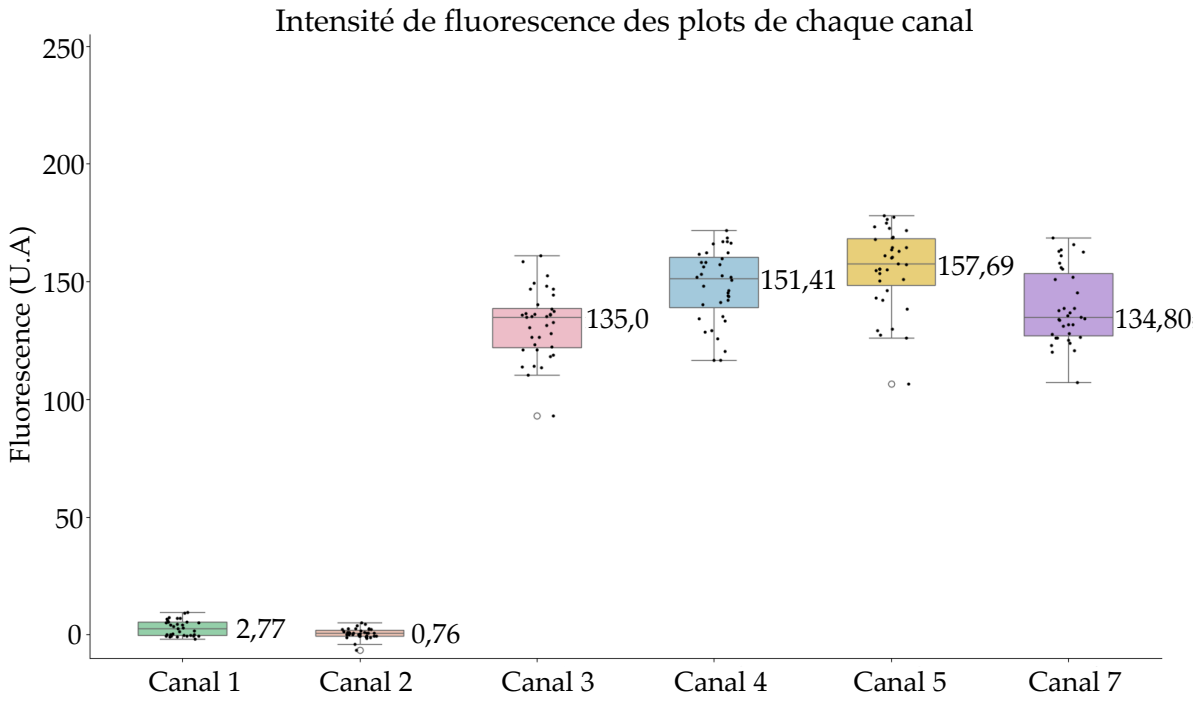


Figure IV.5 : Graphique représentant les valeurs d'intensités moyennes des plots de chaque canal ainsi que la médiane des valeurs d'intensités de chaque canal pour l'expérimentation n° 1.

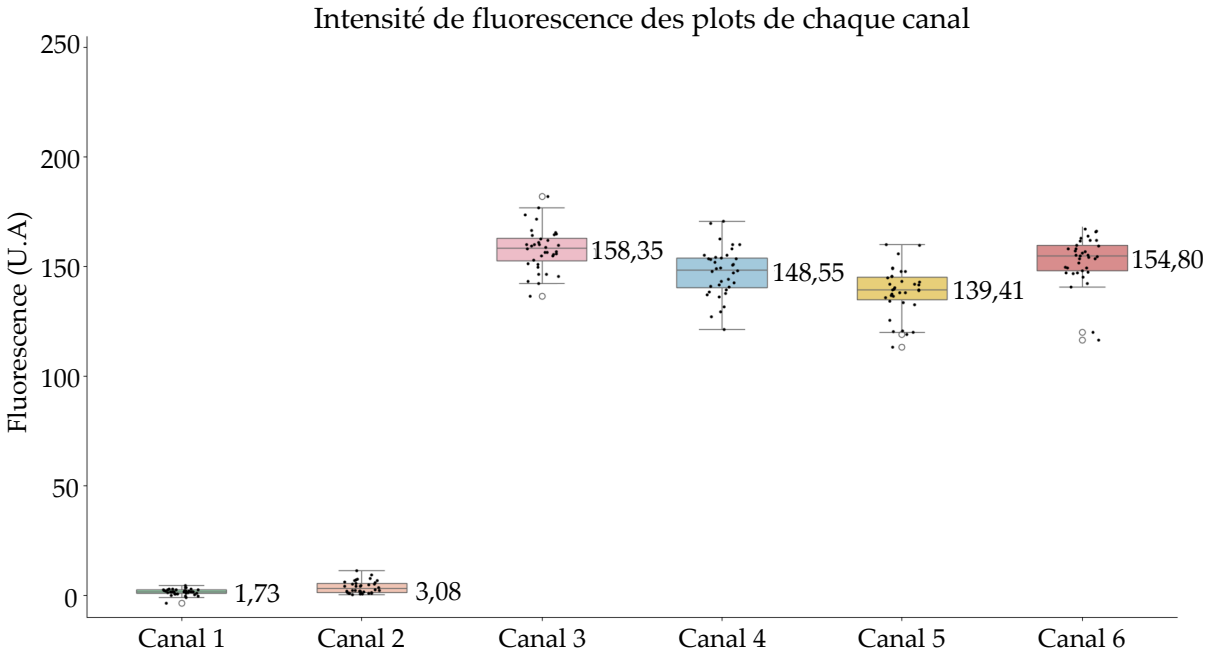


Figure IV.6 : Graphique représentant les valeurs d'intensités moyennes des plots de chaque canal ainsi que la médiane des valeurs d'intensités de chaque canal pour l'expérimentation n° 2.

Les ratios obtenus pour les expériences 1 et 2 sont au moins supérieurs à 48 et 45 respectivement. Ces résultats confirment l'absence d'interaction non spécifique avec les anticorps anti-souris et une reconnaissance spécifique avec la cible d'intérêt d'anticorps anti-lapin AF488.

ii. Reproductibilité des résultats : intracapteur

Pour étudier la reproductibilité des résultats d'un même biocapteur, 4 canaux de détection ont été comparés dans les mêmes conditions (Figure IV.4). La reproductibilité des résultats est évaluée par rapport aux critères utilisés pour les tests ELISA considérant que la variation intra-essais doit être inférieure ou égale à un coefficient de variation de 10 % pour être acceptable et inférieure ou égale à 15 % pour des tests indépendants [165].

Ces deux expérimentations mettent en évidence une variabilité intra-canal acceptable avec des coefficients de variation compris entre 6,1 % et 11,3 % (Tableau IV-1 et Tableau IV-2). Nous pouvons donc conclure que les résultats de fluorescence au sein d'un même canal sont suffisamment reproductibles, même si l'objectif d'un coefficient strictement inférieur à 10 % n'est pas entièrement atteint.

	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 7
CV (%)	10,9	10,4	10,9	11,3

Tableau IV-1 : Coefficients de variation intra-canal de l'expérimentation n° 1.

	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6
CV (%)	6,1	7,6	7,9	7,4

Tableau IV-2 : Coefficients de variation intra-canal de l'expérimentation n° 2.

La variabilité inter-canaux est également acceptable avec un coefficient de variation global inférieur à 15 % pour les deux expérimentations (respectivement 12,4 % et 8,6 %). Les variabilités ne semblent pas liées à la position du canal sur le biocapteur, comme en témoigne l'inversion des niveaux de fluorescence observés entre les deux expérimentations : le canal 3 présente la réponse la plus faible dans l'expérimentation n° 1 tandis qu'elle devient la plus intense dans la seconde, à l'inverse du canal 5. Les variations observées peuvent donc provenir d'hétérogénéités dans la fonctionnalisation de la surface, dans l'injection des échantillons ou dans l'illumination du biocapteur lors de l'acquisition. Pour la suite des expérimentations, il sera donc nécessaire de tenir compte de cette variabilité inter-canaux lors de l'interprétation des résultats.

iii. Reproductibilité des résultats : inter-capteurs

Il est également pertinent d'évaluer si plusieurs expérimentations réalisées dans des conditions identiques produisent des résultats comparables, afin de vérifier la robustesse du système et la reproductibilité globale de la méthode. La Figure IV.7 compile les résultats des deux expérimentations précédentes. Pour la normalisation des données, la même zone témoin a été utilisée, bien que chaque jeu de données ait sa propre image de référence pour calculer les facteurs de normalisation.

Dans un premier temps, on peut observer que l'intervalle min-max des valeurs d'intensité de fluorescence est similaire entre les deux expérimentations et correspond à la

plage de données de l'expérimentation n° 1. En calculant le coefficient de variation à partir de tous les résultats, on obtient une valeur de 10,8 % (moyenne =146,66, écart-type =15,79). Cette analyse met en évidence une reproductibilité inter-capteurs correcte qui valide la fiabilité de la plateforme. Cependant, ces validations n'ont été effectuées que pour deux essais. Idéalement, il aurait fallu répéter ce test 3 à 5 fois pour garantir la reproductibilité des résultats obtenus.

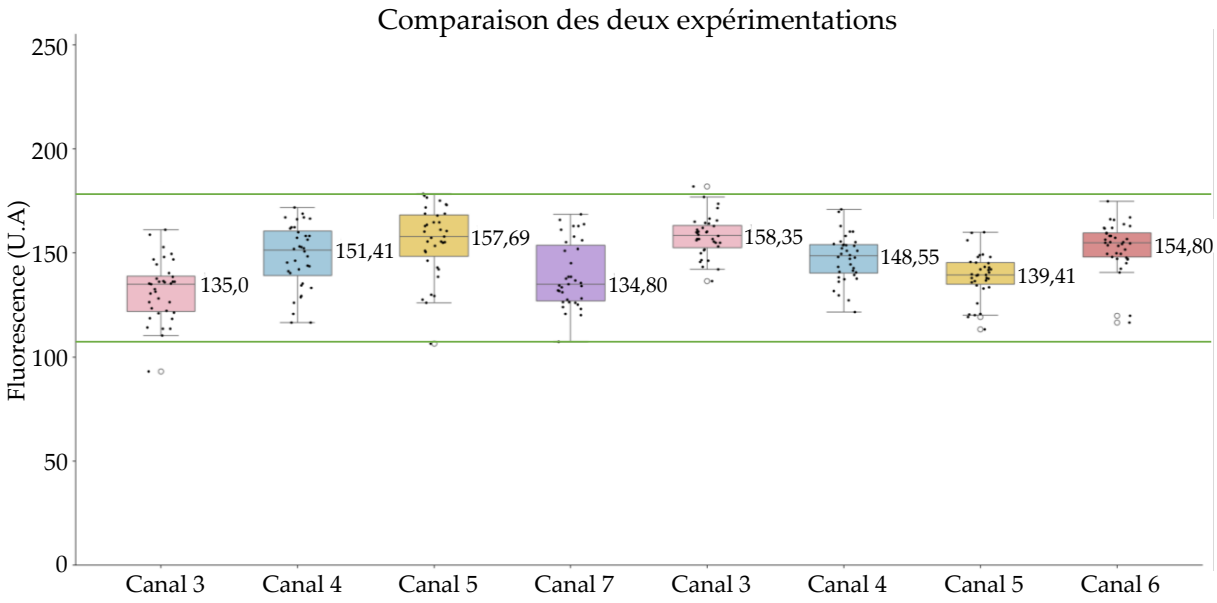


Figure IV.7 : Graphique représentant les valeurs d'intensité des plots de chaque canal pour les deux expérimentations. Les barres vertes correspondent à l'intervalle min-max des valeurs d'intensité de fluorescence qui a pour valeur 70 U.A.

IV.2 Étude des paramètres pouvant influencer l'interaction biorécepteur-cible

Les objectifs sont d'optimiser la biocapture en ajustant les paramètres expérimentaux et d'évaluer la sensibilité de détection de la plateforme.

IV.2.1 Description des différents paramètres

Le protocole de biodétection par fluorescence repose sur plusieurs paramètres ajustables, dont la variation peut influencer les performances du test. Ces paramètres expérimentaux peuvent être regroupés en 3 catégories : les paramètres biochimiques, fluidiques et optiques.

La plateforme optofluidique développée dans cette thèse offre la possibilité de faire varier facilement plusieurs paramètres expérimentaux, permettant d'adapter le protocole en fonction de l'objectif souhaité. Dans cette thèse, les paramètres suivants ont été étudiés :

- Les paramètres biologiques comprenant la concentration de la cible à détecter ainsi que la concentration et la quantité de biorécepteur immobilisé sur le capteur.

- Les paramètres fluidiques comprenant le temps d'injection de la cible dans les canaux de détection et le débit d'injection.

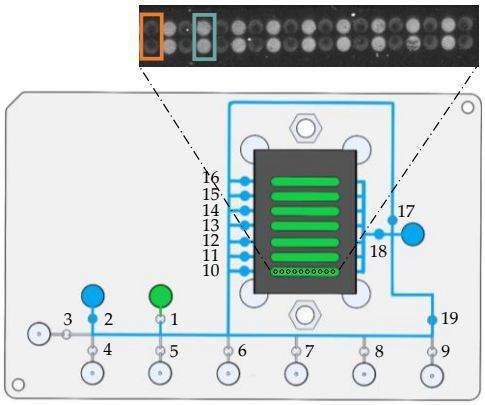
- Le paramètre de temps d'intégration.

IV.2.2 Influence de la concentration et du volume de sonde

i. Concentration du biorécepteur

La concentration du biorécepteur varie fortement dans la littérature avec des valeurs souvent comprises entre 10 µg/mL et 500 µg/mL et pouvant aller jusqu'à 5 mg/mL [166], [167], [168], [169], [170], [171]. Au sein du CEA Leti, des travaux antérieurs sur les biocapteurs ont été réalisés avec une concentration de biorécepteur de 1 mg/mL. Nous avons donc conservé cette concentration de 1 mg/mL, mais également évalué les performances du biocapteur pour une concentration plus faible de 0,1 mg/mL. Ce test a été réalisé avec la cartouche microfluidique composée de 2,4 mm de COC dans la zone de détection.

Pour chaque canal de détection, les 44 plots composant un canal de détection ont donc été répartis en deux groupes correspondant à ces deux concentrations. Tous les autres paramètres modifiables ont été fixés pour réaliser sept réplicats (Figure IV.8).



Paramètres :

- Concentration de la cible : 10 µg/mL
- Concentration du biorécepteur : **0,1 mg/mL** et **1 mg/mL**
- Volume déposé de biorécepteur : 990 pL
- Débit : 50 µL/min
- Temps d'injection : 2 min
- Temps d'intégration : 1000 ms

Figure IV.8 : Expérimentation mise en place pour évaluer l'influence de la concentration de la cible et les paramètres appliqués.

Les résultats présentés sur la Figure IV.9 mettent en évidence une différence significative entre les deux concentrations testées. En moyenne, le signal de fluorescence des plots à la concentration de 1 mg/mL est 4,4 fois plus élevé que les plots à 0,1 mg/mL. On observe également que les écarts-types restent du même ordre de grandeur dans les deux conditions (Tableau IV-3 et Tableau IV-4). Cependant, si l'on compare les coefficients de variation, le CV est de 15,5 % pour une concentration de sonde à 1 mg/mL, contre 28,12 % pour une concentration de 0,1 mg/mL. Ces résultats révèlent donc une variabilité plus importante pour une plus faible concentration de sonde.

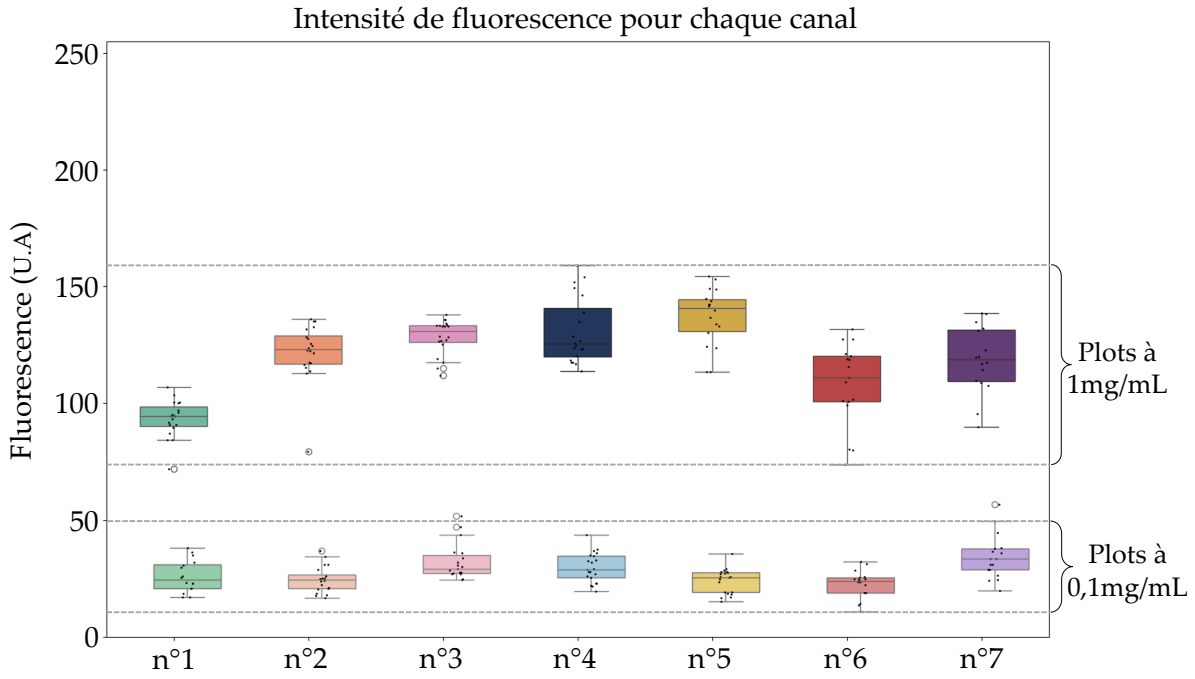


Figure IV.9 : A – Graphique représentant les valeurs d'intensité de fluorescence des plots à 1 mg/mL et 0,1 mg/mL de chaque canal.

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
Q3	30,92	26,7	34,9	34,73	27,66	25,4	37,93
Médiane	24,40	24,43	29,23	28,90	25,47	23,97	33,45
Q1	20,82	20,7	27,36	25,38	19,06	18,8	28,71
Moyenne	26,04	24,53	32,22	29,63	24,00	22,76	34,17
Ecart-type	6,83	5,55	7,66	6,33	5,32	5,87	9,48

Tableau IV-3 : Valeurs des quartiles, de la médiane, de la moyenne et de l'écart-type de chaque canal pour une concentration de 0,1 mg/mL d'anticorps de capture.

	Canal 1	Canal 2	Canal 3	Canal 4	Canal 5	Canal 6	Canal 7
Q3	98,65	129,1	133,46	140,85	144,47	110,94	118,65
Médiane	94,55	123,24	130,90	125,44	140,73	110,94	118,65
Q1	90,14	117,02	126,18	119,85	130,93	100,89	109,4
Moyenne	93,35	122,01	128,49	130,78	137,16	108,15	118,61
Ecart-type	8,02	12,46	7,43	14,16	12,29	17,49	14,36

Tableau IV-4 : Valeurs des quartiles, de la médiane, de la moyenne et de l'écart-type de chaque canal pour une concentration de 1 mg/mL d'anticorps de capture.

À présent, calculons théoriquement le nombre maximal d'anticorps pouvant être immobilisés sur un plot d'environ 250 µm de diamètre, correspondant à une surface de $4{,}91 \times 10^4$ μm^2. Sachant qu'un anticorps occupe une surface théorique comprise entre 10 et 100 nm^2, en prenant donc l'estimation la plus basse (100 nm^2) et en considérant l'hypothèse

d'un dépôt en monocouche, le nombre maximal théorique d'anticorps pouvant être présents sur un plot est alors :

$$N_{max} = \frac{4{,}91 \times 10^{4}}{1{,}00 \times 10^{-4}} = 4{,}91 \times 10^{8} \quad \text{(IV.1)}$$

En comparaison, le nombre d'anticorps déposés à une concentration de 1 mg/mL et pour un volume de 990 pL peut être estimé à partir des calculs suivants :

1. Masse déposée :

$$m = C \times V = 1 \times 9{,}90 \times 10^{-10} = 9{,}90 \times 10^{-10} g = 0{,}99\, ng \quad \text{(IV.2)}$$

2. Nombre de moles, en considérant une masse molaire de 150 kDa :

$$n = \frac{m}{M} = \frac{9{,}90 \times 10^{-10}}{1{,}50 \times 10^{5}} = 6{,}60 \times 10^{-15}\, mol \quad \text{(IV.3)}$$

3. Nombre de molécules :

$$N = nN_A = 6{,}60 \times 10^{-15} \times 6{,}022 \times 10^{23} = 3{,}97 \times 10^{9}\, anticorps \quad \text{(IV.4)}$$

Ainsi, pour une concentration de 1 mg/mL, la quantité d'anticorps déposée est environ 8 fois supérieure à la capacité théorique d'une monocouche sur le plot. À l'inverse, pour une concentration de 0,1 mg/mL, environ $3{,}97 \times 10^{8}\ d'anticorps$ sont théoriquement déposés, soit environ 80 % de la capacité théorique maximale.

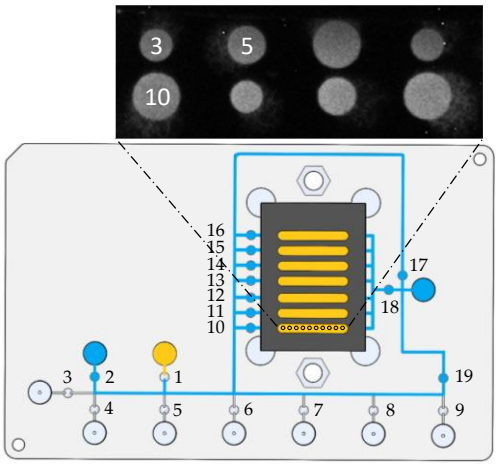
Ces calculs ne prennent toutefois pas en compte les pertes d'anticorps pouvant survenir lors des étapes de lavages du protocole d'immobilisation. Il est donc raisonnable de supposer qu'un dépôt en excès favorise l'obtention d'une quantité plus importante d'anticorps effectivement immobilisés sur la surface. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats expérimentaux présentés plus haut, qui montrent une fluorescence 4,4 fois plus élevée pour une concentration de sonde de 1 mg/mL.

Les résultats expérimentaux montrent également que la plateforme optofluidique permet d'analyser les signaux de fluorescence issus de la reconnaissance biologique avec un anticorps sonde immobilisé à une concentration minimale de 0,1 mg/mL. Elle est également assez sensible pour voir l'influence de la concentration de la sonde sur les performances du biocapteur. Pour la suite de cette étude, la concentration de la sonde a été fixée à 1 mg/mL afin d'obtenir des résultats de fluorescence plus intenses et une meilleure reproductibilité.

ii. Volume déposé de biorécepteur

La méthode de dépôt des anticorps de capture a été présentée dans le chapitre 2. Le système de dépôt par capillaire piézoélectrique utilisé permet de moduler le nombre de gouttes éjectées et donc le volume déposé sur la surface du capteur. Un test a été réalisé avec la cartouche composée d'une fenêtre en verre. La concentration du biorécepteur a été fixée à 1 mg/mL. Au CEA Leti, des travaux précédents ont été menés avec un volume de biorécepteur de 990 pL. Nous avons donc décidé de tester trois volumes différents de biorécepteurs déposés

dans chaque canal : 990 pL (soit 3 gouttes), 1650 pL (5 gouttes) et 3300 pL (10 gouttes). La visualisation des résultats de fluorescence est présentée sur la Figure IV.10. L'injection de la cible a été effectuée deux fois 2 minutes dans chaque canal pour un total de 4 minutes d'injection.



Paramètres :

- Concentration de la cible : 1µg/mL
- Concentration du biorécepteur: 1mg/mL
- Volume déposé de biorécepteur: 990 pL (3 gouttes), 1650 pL (5 gouttes) et 3300 pL (10 gouttes),
- Débit : 50µL/min
- Temps d'injection : 2 min puis 2 min (4 min au total)
- Temps d'intégration : 500ms

Figure IV.10 : Expérience réalisée pour évaluer l'influence du volume de sonde déposé à la surface du biocapteur et les autres paramètres appliqués.

Les valeurs d'intensité de fluorescence mesurées sur les différents canaux et regroupées par nombre de gouttes sont représentées en Figure IV.11. Les comparaisons statistiques entre les différents volumes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney, qui permet de déterminer si deux groupes présentent des différences significatives de distribution ($p < 0,05$) ou non ($p > 0,05$).

Que ce soit pour 2 minutes ou 4 minutes d'injection, les trois volumes déposés ne montrent statistiquement aucune variation significative de fluorescence entre eux ($p > 0,05$ pour l'ensemble des comparaisons). Pour une concentration d'anticorps de capture à 1 mg/mL, l'augmentation du volume de la sonde au moment du dépôt n'a ni amélioré ni détérioré les performances du biocapteur.

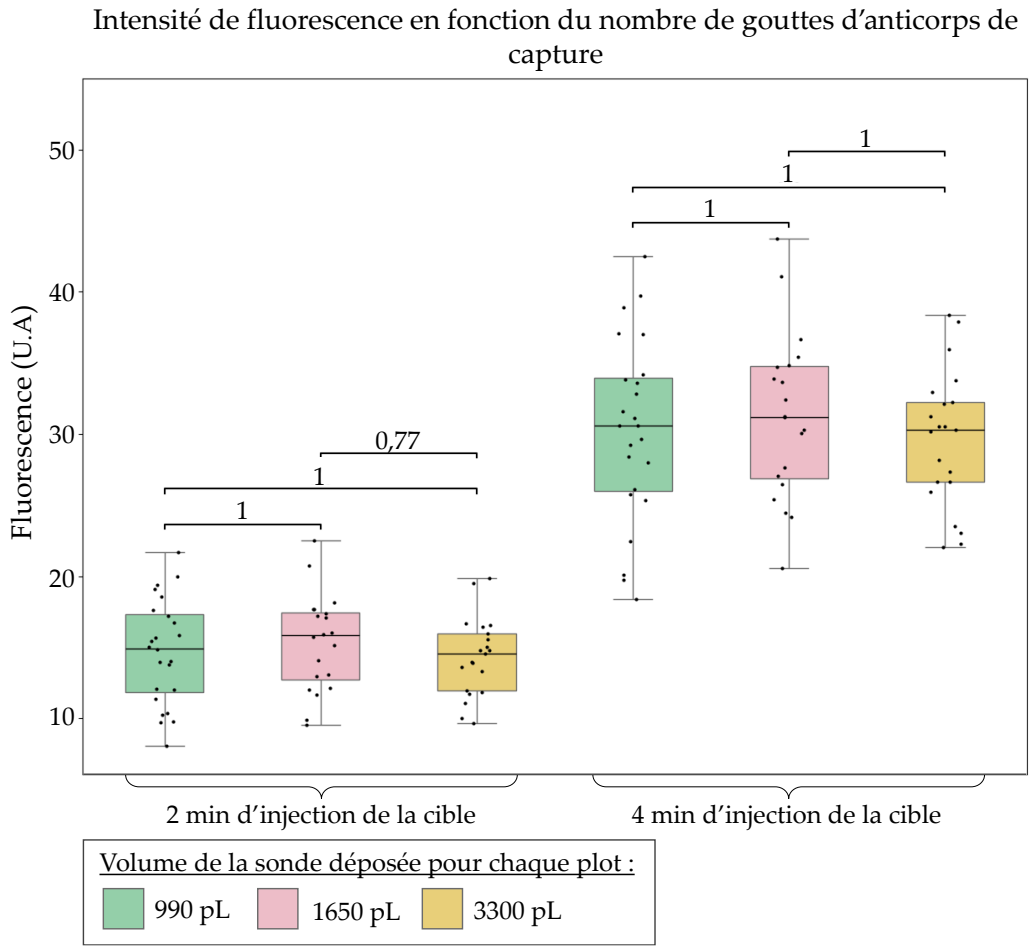


Figure IV.11 : Graphique représentant les valeurs d'intensité des plots en fonction du nombre de gouttes déposées après 2 min puis 4 min. Les différences de résultats entre les volumes déposés ont été évaluées par des tests non paramétriques de Mann-Whitney.

Cependant, la taille des plots augmente avec le volume déposé, ce qui favorise l'apparition de « bavures » comme observé pour la condition d'un volume de 3330 pL (10 gouttes) sur la Figure IV.10. Le volume de sonde déposé a donc été fixé à 990 pL (3 gouttes) pour la suite de cette étude.

IV.2.3 Influence du temps d'injection

Le temps d'injection est un paramètre important qui impacte la quantité d'échantillons utilisée et la durée du test. Dans la littérature, il varie en fonction de la concentration de la cible à détecter. En effet les concentrations d'anticorps cibles à détecter varient de 1 ng/mL à 10 µg/mL avec des volumes injectés allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de microlitres selon les systèmes et avec des temps d'injection allant de 5 minutes à 20 minutes, [166] [172] [173] [174] [175].

Pour étudier ce paramètre, le protocole a été exécuté plusieurs fois sous forme de cycles (Figure IV.12). Le programme Python initial a été modifié pour pouvoir effectuer des injections séquentielles dont la durée et le nombre de répétitions sont choisis par l'utilisateur (Annexe L).

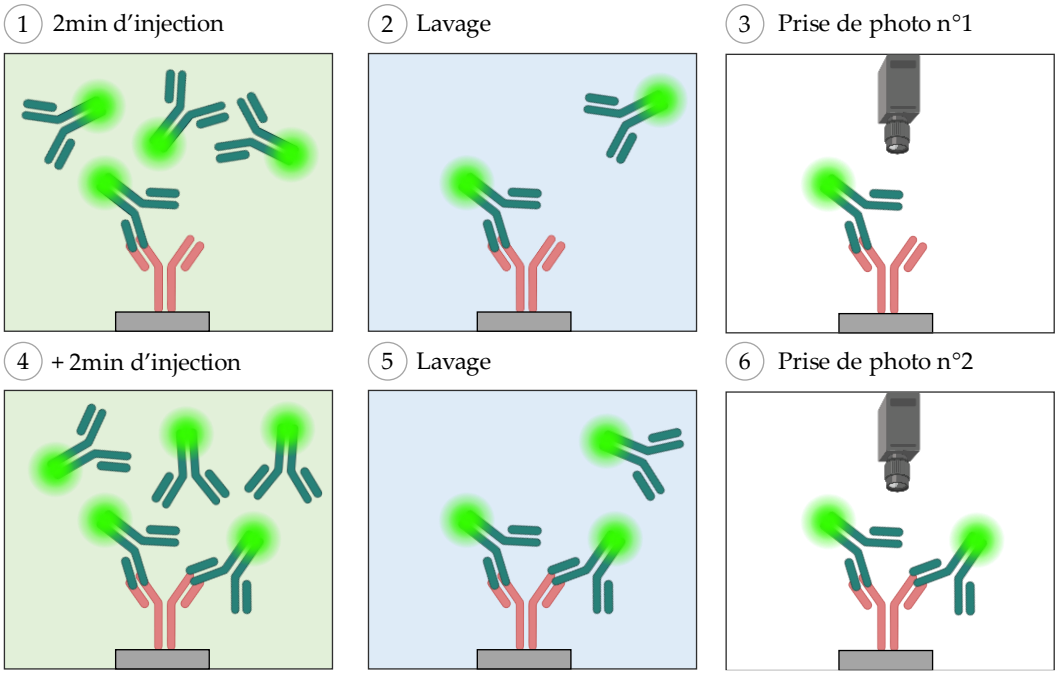


Figure IV.12 : Exemple de protocole d'injection comprenant deux cycles - cycle 1 (étapes 1, 2, 3) et cycle 2 (étapes 4, 5, 6).

L'expérience a été répétée deux fois à deux concentrations d'anticorps anti-lapin AF488 cible différentes (10 µg/mL et 1 µg/mL) avec la cartouche composée d'une fenêtre en verre. Pour chaque test, un contrôle négatif avec des anticorps anti-souris AF88 à une concentration de 1 µg/mL a été réalisé. Sept injections d'une durée de 2 min chacune ont été réalisées dans les canaux de détection à un débit de 50 µL/min. Les images prises au cours du temps ont un temps d'intégration fixé à 500 ms. Les résultats de ces expérimentations sont présentés sur le graphique de la Figure IV.13 qui représente l'évolution de la fluorescence au cours du temps et montre une augmentation du signal lorsque l'on prolonge le temps d'injection. De plus, l'analyse des courbes montre que la cinétique de biocapture dépend de la concentration de la cible. À concentration élevée (10 µg/mL), le signal augmente très rapidement et sature après 6 min d'injection, tandis qu'à plus faible concentration (1 µg/mL), l'augmentation du signal est plus progressive et nécessite un temps d'injection plus long.

À une concentration de 1µg/mL d'anticorps anti-lapin AF488, et après 2 minutes d'injection (100 µL), le rapport signal sur bruit (S/B) est de 16 pour le test n°1 et de 9 pour le test n°2, en comparaison avec le témoin négatif le plus intense. Ces valeurs indiquent une réponse spécifique dès les premières minutes d'injection.

Le graphique montre également que les deux concentrations d'anticorps AF488 atteignent des niveaux de fluorescence similaires pour 2 minutes d'injection de la cible à 10 µg/mL et pour 14 minutes de la cible à 1 µg/mL, pour les deux tests (Figure IV.13).

Pour comparer ces deux conditions, il faut tenir compte de la quantité totale de molécules injectées dans le canal. Ainsi, 100 µL d'échantillon à 10 µg/mL (ou 66,7 nM) correspond à $4{,}02 \times 10^{12}$ molécules injectées, tandis que 700 µL à 1 µg/mL (ou 6,67 nM)

représentent 2,81 x10^{12} molécules, soit 30 % de moins. Pour un même ordre de grandeur de molécules injectées, les signaux de fluorescence sont équivalents.

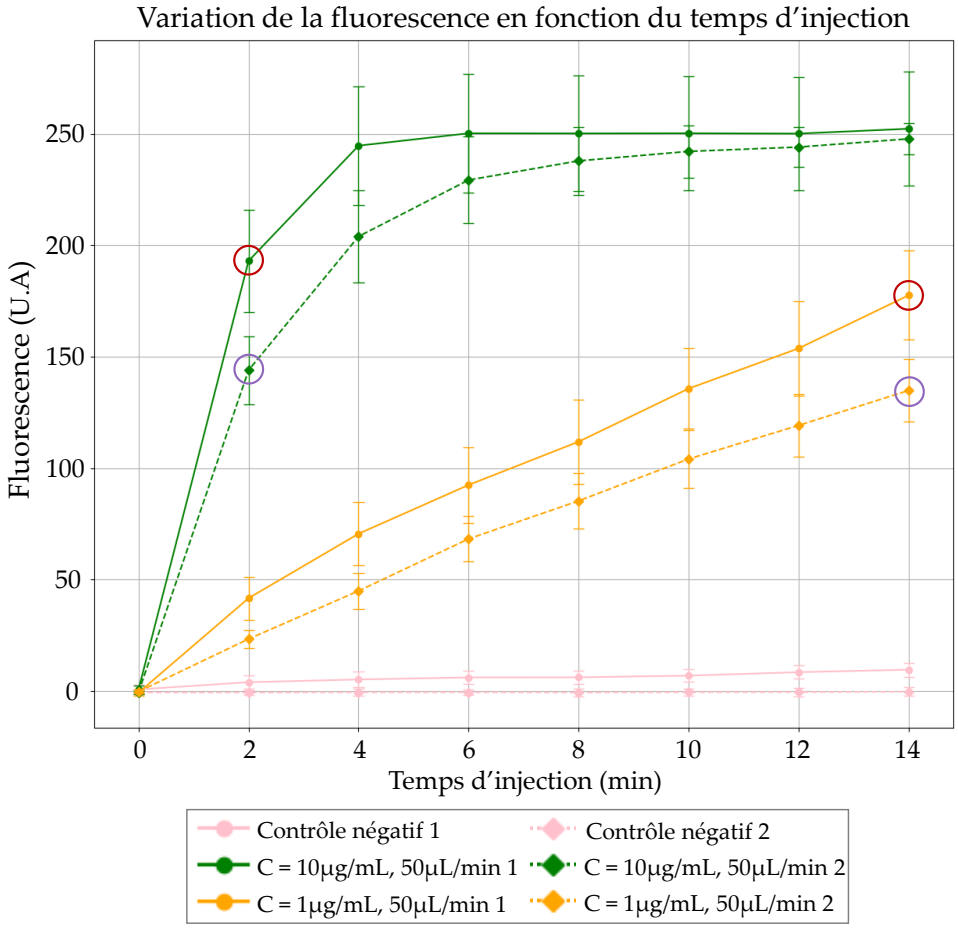


Figure IV.13 : Graphique représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du temps d'injection pour une concentration de cible à 10 µg/mL et 1 µg/mL et un débit de 50 µL/min pour deux expérimentations. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence et les barres d'erreur à l'écart-type associé. Les contrôles négatifs correspondent à l'injection d'anticorps anti-souris AF488 à une concentration de 1 µg/mL et un débit de 50 µL/min. Les cercles rouges et violets mettent en évidence que l'intensité de fluorescence est similaire pour 2 minutes d'injection à 10 µg/mL et 14 minutes d'injection à 1 µg/mL.

À partir de cette hypothèse, nous pouvons donc calculer le temps d'injection théorique nécessaire pour que la concentration de cible à 1 µg/mL atteigne le plateau de saturation. Pour le test n° 1, considérons que nous atteignons une saturation à partir de 6 minutes d'injection de la cible à 10 µg/mL, ce qui signifie qu'il faut injecter 1,21x10^{13} molécules pour atteindre ce plateau. Si on prend en compte les 30 % d'écart observés précédemment, alors il faudrait entre 1,21x10^{13} et 1,57x10^{13} molécules à injecter pour que la concentration de 1 µg/mL atteigne le plateau de saturation, ce qui revient à un volume de cible injecté compris entre 3 mL et 3,9 mL. La saturation aurait donc lieu entre 42 minutes et 60 minutes d'injection au total.

Concernant le second test, le plateau de saturation est atteint après 10 minutes d'injection (sans saturation instrumentale) pour la concentration à 10 µg/mL, soit l'équivalent de 2,01x10^{13}

molécules injectées. Toujours en prenant en compte les 30 % d'écart observés, il faudrait donc injecter entre $2{,}01 \times 10^{13}$ et $2{,}61 \times 10^{13}$ molécules pour que la concentration de 1 µg/mL atteigne le plateau de saturation. Cela revient à un volume compris entre 5 mL et 6,5 mL, ce qui correspond à une durée d'injection comprise entre 70 minutes et 100 minutes.

Les courbes observées sur le graphique (Figure IV.13) pour une concentration de cible de 10 µg/mL présentent une forme qui rappelle une cinétique de pseudo-ordre 1. La dynamique de fluorescence pourrait donc être décrite par l'équation [171]:

$$I(t) = I_{max}(1 - e^{-t/\tau}) \quad \text{(IV.5)}$$

Avec :

- $I(t)$, l'intensité de fluorescence mesurée à l'instant t.
- I_{max}, l'intensité maximale de fluorescence (255 U.A).
- τ, le temps caractéristique sachant que $\tau = \frac{1}{k}$, avec k la constante de cinétique apparente.

Cette équation permet de décrire l'évolution temporelle du signal de fluorescence vers un état d'équilibre en reliant l'évolution de la fluorescence à la constante de cinétique apparente k. Lorsque $t = \tau$, l'intensité de fluorescence atteint environ 63 % de l'intensité maximale ($I(t) = 0{,}63.I_{max}$) et lorsque $t = 3\tau$, l'intensité est proche de la saturation, atteignant environ 95 % du plateau ($I(t) = 0{,}95.I_{\text{max}}$).

Pour confirmer l'hypothèse que l'intensité de fluorescence suit bien une cinétique de premier ordre, nous appliquons une régression de pseudo-ordre 1 sur les courbes présentées précédemment pour une concentration de cible de 10 µg/mL (Figure IV.14). L'ajustement du modèle de pseudo-ordre 1 aux données expérimentales permet d'évaluer l'hypothèse de cette cinétique en comparant les dynamiques mesurées à leurs courbes théoriques attendues. Pour les deux tests, la régression est très bien ajustée aux données comme l'attestent les coefficients de détermination $R^2 \geq 0{,}999$. Cela confirme que la fluorescence suit bien une évolution exponentielle vers un plateau, fixé soit par la saturation du capteur, soit par une saturation des sites biologiques, dans cette configuration.

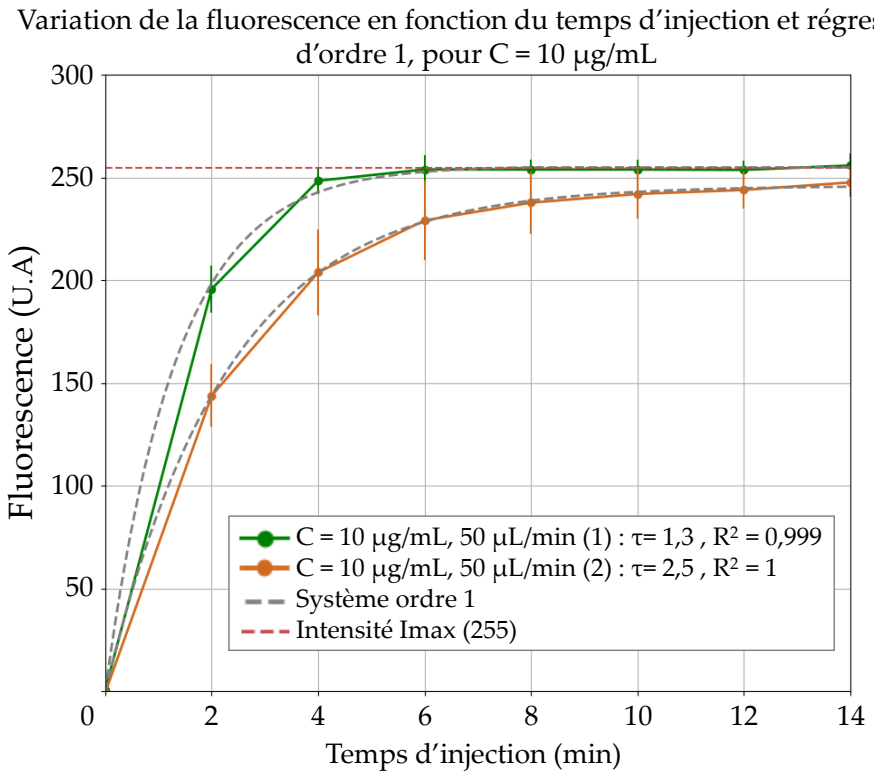


Figure IV.14 : Graphique représentant la variation de fluorescence en fonction du temps pour une concentration de 10 µg/mL d'anticorps cibles AF488. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence dans un canal et les barres d'erreur à l'écart-type associé. Une régression de pseudo-ordre 1 est superposée pour chaque courbe et les valeurs de τ et du coefficient de détermination sont présentées en légende.

Nous avons supposé plus tôt que le plateau de saturation était atteint aux alentours de 255 U.A. Ainsi, pour les concentrations de 1 µg/mL qui n'atteignent pas leur plateau de saturation après 14 minutes d'injection, nous appliquons la régression du pseudo premier ordre en limitant l'intensité maximale I_{max}à la valeur de la saturation instrumentale, soit 255. La régression est donc forcée à atteindre 255, si le plateau théorique initial dépasse cette valeur. Cette approche est effectuée pour évaluer le temps d'injection qu'il faudrait utiliser pour atteindre un plateau de saturation pour une concentration de cible de 1 µg/mL.

Le graphique obtenu (Figure IV.15) montre que l'ajustement reste très bon, avec des coefficients de détermination $R^2 \geq 0{,}994$, ce qui confirme nos hypothèses malgré la contrainte imposée pour I_{max}. D'après les valeurs de τ, la courbe jaune atteindrait son plateau après 60 minutes d'injection, tandis que la courbe bleue l'atteindrait après 96 minutes d'injection de l'échantillon à une concentration de 1 µg/mL. Ces durées sont cohérentes avec les estimations précédentes obtenues à partir du calcul théorique basé sur la quantité de molécules à injecter pour atteindre ce seuil.

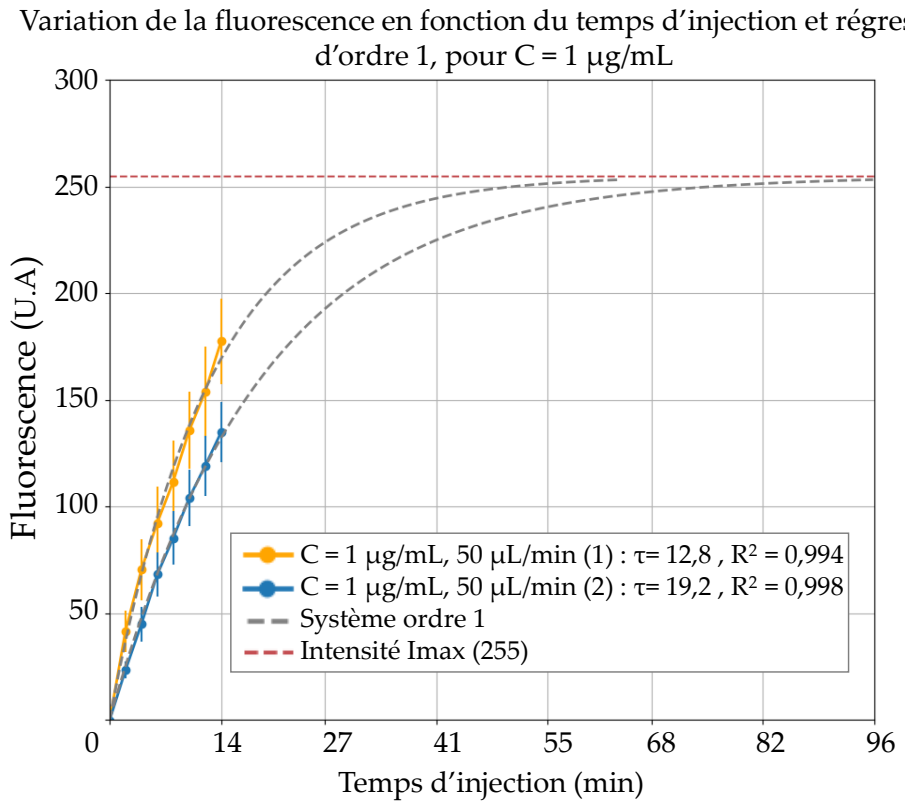


Figure IV.15 : Graphique représentant la variation de fluorescence en fonction du temps pour une concentration de 1 µg/mL d'anticorps cibles AF488. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence dans un canal et les barres d'erreur à l'écart-type associé. Une régression de pseudo-ordre 1 est superposée pour chaque courbe et les valeurs de τ et du coefficient de détermination sont présentées en légende.

Grâce à l'analyse du paramètre de temps d'injection, nous avons pu mettre en évidence que la dynamique de fluorescence observée suit une cinétique de pseudo-premier ordre. D'un point de vue physico-chimique, cette loi exponentielle correspond à une interaction de type Langmuir entre les anticorps de capture et les anticorps cibles AF488 [176]. Plus particulièrement, cela correspond à une cinétique d'association très souvent étudiée, notamment par les capteurs SPR [177].

$$I(t) = \left[\frac{k_a.[C].R_{max}}{k_a.[C]+k_d}\right].(1 - e^{-(k_a.c+k_d)t}) \qquad \text{(IV.6)}$$

Avec :

- k_a et k_d, les constantes d'association et de dissociation respectivement.
- [C], la concentration en analyte.
- R_{max}, le plateau de saturation.

À partir de l'équation IV.2, il serait en principe possible de déterminer les constantes d'association et de dissociation en travaillant avec les données de fluorescence pour différentes concentrations [C] d'analyte. La constante cinétique apparente k_{obs}, est définie par :

$$k_{obs} = k_a.[C] + k_d \quad \text{(IV.7)}$$

Elle caractérise la vitesse à laquelle le signal de fluorescence approche du plateau R_{max} pour une concentration donnée. En mesurant la dynamique de fluorescence pour plusieurs concentrations, il est possible d'extraire k_{obs} et d'en déduire k_a et k_d. Cela permettrait également d'estimer la constante d'affinité k_D correspond au rapport de k_a sur k_d et ainsi de caractériser l'affinité entre les anticorps de capture et les anticorps cibles AF48. Cependant dans notre étude, seules deux concentrations ont été utilisées alors qu'il en faudrait au minimum 3 pour extraire ces informations.

Le plateau de saturation qui a été observé expérimentalement peut, à la fois, être attribué au plateau de saturation instrumentale et/ou biologique. Théoriquement, un plot peut contenir au maximum $4{,}91 \times 10^8$ anticorps lapin (sonde) selon l'estimation la plus basse, ou $4{,}91 \times 10^9$ anticorps lapin selon l'estimation la plus haute. Pour une concentration de 10 µg/mL d'anticorps, le plateau est atteint après 6 min d'injection, correspondant à $1{,}21 \times 10^{13}$ molécules injectées. Si l'on fait l'hypothèse d'une répartition uniforme des cibles sur les 44 plots de détection, chaque plot a ainsi accès théoriquement à $2{,}75 \times 10^{11}$ molécules d'anticorps anti-lapin. En faisant l'hypothèse qu'une sonde immobilise une seule cible, cette quantité est 56 à 560 fois supérieure à la capacité théorique de capture d'un plot, selon que l'on considère l'estimation haute ou basse. Toutefois, toutes les molécules d'anticorps présentes dans le flux ne rentrent pas nécessairement en contact avec la surface pour s'y immobiliser. Ici, bien que nous ayons une saturation de la quantité de cibles injectées, le plateau de saturation correspond plutôt à une saturation instrumentale liée à la caméra 8 bits et aux paramètres optiques, avec une valeur maximale atteignable de 255 U.A. Ce sont donc les paramètres de la caméra, notamment le temps d'intégration, qui semblent donc influencer l'apparition d'un plateau de saturation.

IV.2.4 Influence du temps d'intégration

Le temps d'intégration est un paramètre d'acquisition influençant directement l'intensité de fluorescence mesurée, l'amplitude du signal ainsi que le rapport signal/bruit. Comme expliqué dans le Chapitre III, augmenter le temps d'intégration permet de détecter des niveaux de fluorescence faibles. On constate, en effet, cette tendance sur le graphique de la Figure IV.16, qui présente l'évolution des intensités de fluorescence mesurées dans un même canal après injection d'une cible à une concentration de 1 µg/mL, pour différents temps d'intégration (500 ms, 800 ms, 1000 ms et 2000 ms). Pour ce test, la normalisation par facteur n'a pas été appliquée pour ne pas masquer l'effet du temps d'intégration sur les valeurs de fluorescence. Une augmentation du temps d'intégration conduit à une intensité de fluorescence plus élevée ainsi qu'à une modification de l'allure de la réponse au cours du temps. Pour un temps d'intégration de 2000 ms, le signal de fluorescence atteint un plateau traduisant une saturation de l'intensité mesurée par le banc optique. En revanche, pour un temps d'intégration de 500 ms, la courbe est encore dans un régime transitoire. Un temps d'injection de la cible plus long serait donc nécessaire à ce temps d'intégration pour atteindre un plateau de saturation biologique ou de saturation instrumentale.

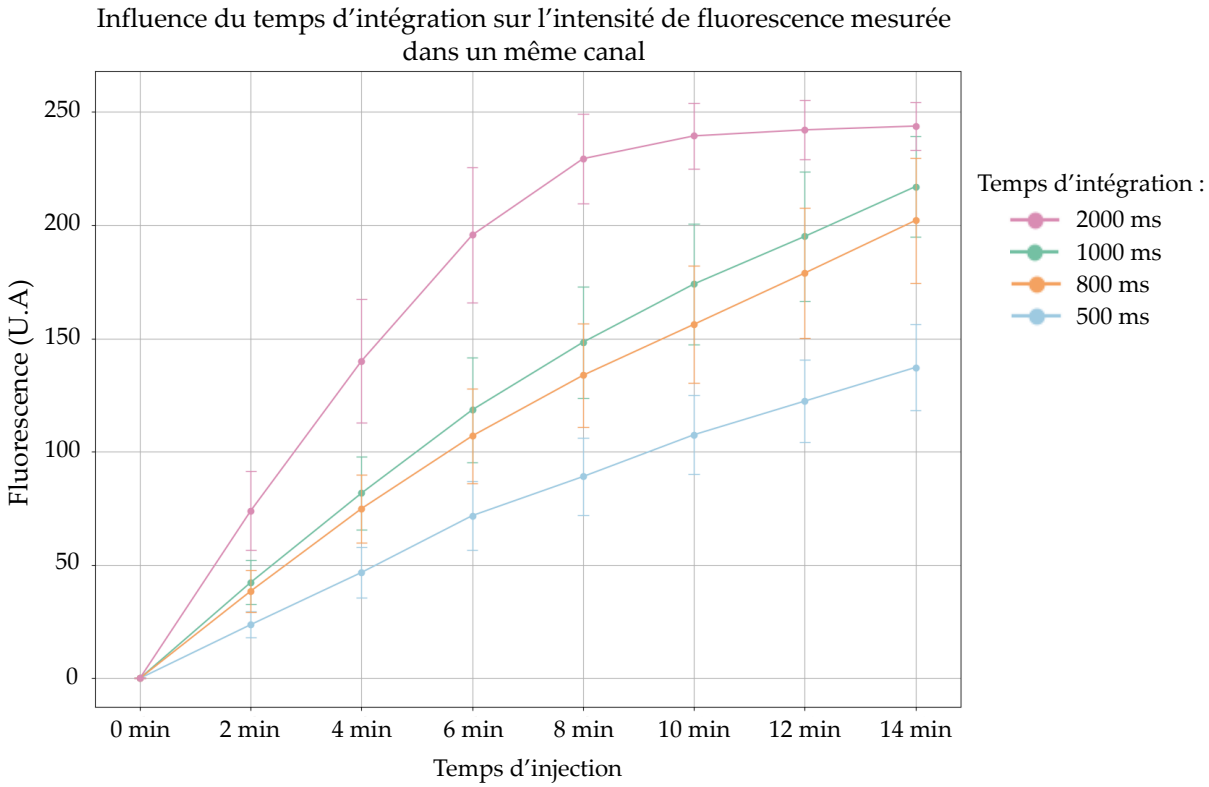


Figure IV.16 : Graphique représentant l'impact du temps d'intégration sur l'évolution temporelle d'un signal de fluorescence pour une concentration de cible de 1 µg/mL. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence et les barres d'erreur à l'écart-type associé.

Le temps d'intégration constitue donc un paramètre d'acquisition déterminant en fluorescence, car il conditionne directement l'amplitude du signal ainsi que sa dynamique temporelle. Un temps d'intégration élevé permet d'améliorer la détection de signaux faibles, mais peut également conduire à une perte d'information en atteignant trop rapidement le plateau de saturation. Le choix du temps d'intégration doit donc être optimisé en fonction de l'objectif expérimental, notamment en fonction de la concentration cible à détecter. Si cette concentration est élevée, il vaut mieux travailler avec un temps d'intégration faible pour éviter la saturation du signal. Au contraire, une concentration plus faible nécessitera un temps d'intégration élevé pour détecter le signal de fluorescence. Dans notre cas, à chaque expérimentation, plusieurs images ont été acquises avec différents temps d'intégration pour s'assurer d'obtenir un signal mesurable et non saturé.

IV.2.5 Influence du débit

L'efficacité de la biocapture est également fortement influencée par le transport de masse, qui décrit le transport des molécules dans un fluide. Il repose essentiellement sur deux phénomènes physiques : la diffusion et la convection. La diffusion est un processus passif qui conduit les particules d'une zone de forte concentration vers une zone de faible concentration. La convection, quant à elle, correspond au déplacement de particules transportées par le mouvement du fluide dans lequel elles se trouvent. Dans des canaux microfluidiques, l'écoulement laminaire transporte les biomolécules. L'absence de mélange transversal (turbulences) limite donc l'interaction entre la cible et les biorécepteurs. Seule la diffusion

permet aux molécules d'atteindre la surface du biocapteur [178]. La convection reste tout de même un atout pour la biocapture puisqu'elle assure un renouvellement du fluide et favorise l'apport de biomolécules pouvant être capturées.

Mazzaracchio et *al.* montrent que l'utilisation d'un flux contrôlé en microfluidique peut améliorer le transport de masse. En optimisant le débit d'injection des analytes, leur protocole d'immunodosage est passé de 1 h 30 à 7 min en l'intégrant dans un système microfluidique [179]. De manière générale, la vitesse d'un immunodosage dépend principalement de l'efficacité du transport de masse entre les biomolécules et la surface du biocapteur [180]. De nombreuses recherches tentent d'améliorer la rapidité de ces tests, notamment avec des méthodes actives (acoustophorèse, capture magnétique, électrocinétique) [181]. Dans notre cas, nous travaillons avec un dispositif passif, ne faisant pas appel à des sources d'énergie externes autres que l'écoulement fluidique imposé par un débit.

Plusieurs études réalisent des tests préliminaires afin de déterminer le débit optimal pour leur système. Certaines études montrent que l'augmentation du débit d'injection de la cible (1, 2, 4, 6, 8 et 10 µL/min) diminue l'intensité de leur signal [80]. Alors que dans d'autres systèmes, le débit le plus faible n'est pas forcément le plus efficace. Ainsi pour un autre système microfluidique, un débit intermédiaire de 20 µL/min a été identifié comme optimal après l'étude d'une plage de débit comprise entre 15 et 35 µL/min [182], tandis qu'une seconde étude rapporte un débit optimal autour de 10 µL/min [179]. Dans l'ensemble, ces travaux montrent que le débit ne suit pas une tendance universelle et est un paramètre fortement dépendant de l'architecture du système fluidique.

Nous avons donc étudié ce dernier paramètre pour une concentration de cible de 1 µg/mL. Comme précédemment, l'injection de la cible a été effectuée séquentiellement avec sept cycles de 2 min. Trois débits ont été testés : 50 µL/min, 100 µL/min et 150 µL/min. Il est à noter que les débits étudiés sont plus élevés que ceux utilisés dans la littérature. Ce choix résulte de contraintes expérimentales liées à la sensibilité de la méthode d'actionnement en flux continu par rapport aux bulles. Malgré une étape de purge, certaines bulles peuvent se retrouver piégées dans le tube de sortie, entrainant un arrêt du flux et la perturbation des expérimentations (chapitre III).

Pour chaque test, un contrôle négatif avec des anticorps anti-souris AF88 à une concentration de 1 µg/mL a été effectué. L'acquisition d'images a été réalisée avec un temps d'intégration de 500 ms.

La Figure IV.17 présente la cinétique des signaux de fluorescence pour les trois conditions de débit. Deux essais indépendants ont été réalisés avec la cartouche composée d'une fenêtre en verre. Dans les deux cas, les contrôles négatifs restent proches de zéro. Les cinétiques obtenues pour 50 µL/min et 100 µL/min sont très similaires, avec une superposition importante des barres d'erreur. À 150 µL/min, on observe une tendance vers des valeurs légèrement inférieures, en particulier dans le test n° 2, mais cela ne permet pas de conclure à une différence significative compte tenu de la variabilité expérimentale.

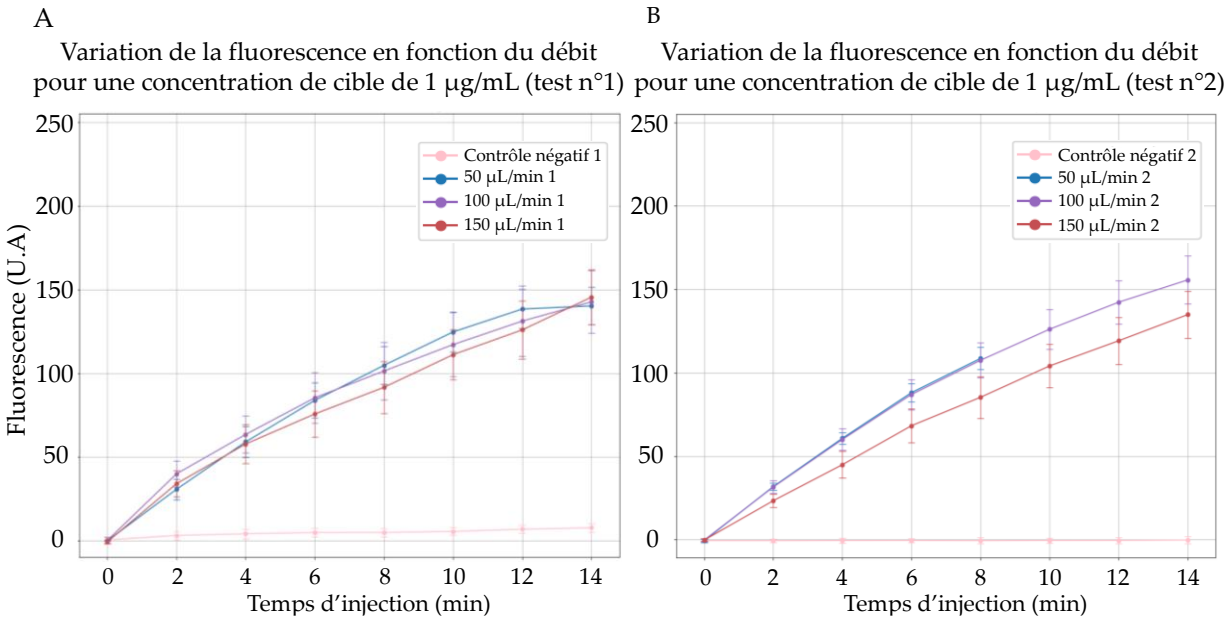


Figure IV.17 : Graphique représentant l'évolution temporelle du signal de fluorescence lors de l'injection d'une cible à une concentration de 1 µg/mL pour trois débits différents (50, 100 et 150 µL/min). Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence dans un canal et les barres d'erreur à l'écart-type associé. Les contrôles négatifs correspondent à l'injection d'anticorps anti-souris AF488 à une concentration de 1 µg/mL à 50 µL/min.

Pour quantifier les observations issues des cinétiques présentées sur la Figure IV.17, une analyse des pentes a été réalisée. Pour chaque plot de détection, les pentes ont été calculées sur les intervalles 0 - 2 min, 2 - 4 min, de 4 – 6 min et 6 - 8 min. Les Tableau IV-5 et Tableau IV-6 regroupent la valeur moyenne de toutes les pentes ainsi que l'écart-type associé pour chaque condition de débit. Pour les deux tests, les valeurs moyennes des pentes obtenues pour 50 µL/min et 100 µL/min sont très proches, avec des écarts-types qui se superposent, ce qui indique l'absence de différence marquée entre ces deux conditions. À 150 µL/min, une différence est observée avec des pentes moyennes plus faibles par rapport aux deux autres conditions, plus prononcée pour le test n° 2. Cependant, cette différence reste inférieure à la variabilité expérimentale comme le montrent les valeurs d'écarts-types.

Test n°1	50 µl/min	100 µl/min	150 µl/min
Moyenne des 4 premières pentes	13,10	12,64	11,53
Ecart-type	2,60	5,21	4,29

Tableau IV-5 : Moyennes et écarts-types des pentes de fluorescence du test n°1 calculées à partir des intervalles 0 - 2 min, 2 - 4 min, de 4 – 6 min et 6 - 8 min, pour les 3 conditions de débits.

Test n°2	50 µl/min	100 µl/min	150 µl/min
Moyenne des 4 premières pentes	13,66	13,47	10,69
Ecart-type	2,39	2,58	2,12

Tableau IV-6 : Moyennes et écarts-type des pentes de fluorescence du test n°1 calculées à partir des intervalles 0 - 2 min, 2 - 4 min, de 4 – 6 min et 6 - 8 min, pour les 3 conditions de débits.

De plus, si l'on compare les coefficients de variation moyen présentés dans les Tableau IV-7 et Tableau IV-8, on remarque que les coefficients intra-canaux sont équivalents aux coefficients inter-canaux pour le test n°1, avec des CV entre 12,13 % et 17,17 %. Pour le test n°2, les CV moyens intra-canaux sont majoritairement inférieurs à 10 %. Cependant les CV moyens inter-canaux sont autour de 15 %. Ces variations restent donc dans les critères validant la reproductibilité des résultats obtenus [165]. On peut donc confirmer qu'il n'y a pas d'influence significative du débit sur les performances du biocapteur dans ces conditions expérimentales.

Test n°1 : comparaison	CV moyen (%)
50 µl/min	12,13
100 µl/min	16,62
150 µl/min	16,73
50 µl/min / 100 µl/min	15,07
50 µl/min / 150 µl/min	15,08
100 µl/min / 150 µl/min	17,17
50 / 100 / 150	16,01

Tableau IV-7 : Comparaison des coefficients de variation pour chaque débit individuel, puis par paire et les trois ensemble pour le test n°1.

Test n°2 : comparaison	CV moyen (%)
50 µl/min	6,09
100 µl/min	7,89
150 µl/min	14,20
50 µl/min / 100 µl/min	9,06
50 µl/min / 150 µl/min	16,52
100 µl/min / 150 µl/min	16,03
50 / 100 / 150	14,74

Tableau IV-8 : Comparaison des coefficients de variation pour chaque débit individuel, puis par paire et les trois ensemble pour le test n°2.

Ces premiers résultats ne permettent pas de conclure à un effet significatif du débit sur les performances du biocapteur à cette concentration de 1 µg/mL.

IV.2.6 Influence des différents paramètres sur la sensibilité de détection

Nous avons pu voir dans les sections précédentes l'influence individuelle des paramètres expérimentaux sur les performances du biocapteur. Après avoir réalisé ce travail, l'objectif était de combiner les paramètres optimisés pour évaluer la sensibilité de l'immunodétection avec la plateforme optofluidique. D'après les résultats précédents, nous avons pu observer que les concentrations de cible AF488 à 1 µg/mL sont détectables rapidement (S/B > 9) avec les paramètres expérimentaux suivants :

- Concentration du biorécepteur : 1 mg/mL.
- Volume de biorécepteur déposé : 990 pL (3 gouttes).
- Temps d'injection : 2 min.
- Temps d'intégration : 500 ms.
- Débit 50 µL/min.

Deux nouvelles concentrations de cible ont été étudiées par la suite : 100 ng/mL et 10 ng/mL. Pour ces tests, la concentration de la sonde a été fixée à 1 mg/mL et son volume à 990 pL d'après les résultats précédents. L'injection de la cible a été effectuée séquentiellement avec 10 cycles de 2 minutes. Ne sachant pas quelle sera la réponse du biocapteur vis-à-vis de ces concentrations, plusieurs acquisitions avec différents temps d'intégration ont été réalisées après chaque cycle d'injection (500, 800, 1000, 2000, 4000 et 6000 ms). Les trois débits ont été également testés, mais comme expliqué dans la section précédente, celui-ci n'ayant pas de réelle influence sur le résultat, nous présenterons les résultats pour un débit de 50 µL/min. Pour ce test, le contrôle négatif avec les anticorps anti-souris AF488 n'a pas pu être réalisé en parallèle de la biodétection à cause de problèmes techniques.

La sensibilité d'un système de détection, c'est-à-dire sa capacité à distinguer de faibles concentrations d'analyte, est directement liée à sa limite de détection (LOD). La LOD correspond à la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de manière fiable au-dessus du bruit de fond du système. Elle peut être déterminée de plusieurs façons [163], notamment en la calculant à partir des signaux mesurés sur des échantillons témoins sans analyte d'intérêt (contrôle négatif) [183] :

$$LOD = < I_{bg} > +3\sigma \qquad \text{(IV.8)}$$

Avec $< I_{bg} >$, la moyenne des intensités du contrôle négatif de tous les canaux après injection de PBS 1X et avant l'injection des cibles fluorescentes et σ l'écart-type associé.

Dans notre cas, l'absence de contrôle négatif nous a conduits à effectuer une première validation qualitative de la sensibilité de la plateforme à partir du bruit de fond des canaux remplis de PBS 1X avant injection de la cible. Cette approche est basée sur les recommandations de l'ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) qui, en l'absence de contrôle négatif, suggère d'utiliser une région de bruit de fond (baseline) [163].

Un temps d'intégration de 6000 ms a été utilisé afin de pouvoir analyser les résultats de fluorescence pour les deux concentrations de cible.

Pour déterminer si nos concentrations sont détectables, la moyenne du bruit de fond local des deux canaux, Mb, a été calculée ainsi que l'écart-type des données de bruit de fond, σ. Ainsi, on obtient un seuil de 27,75 U.A pour un temps d'intégration de 6000 ms, qu'on appellera seuil du bruit de fond, Sbf.

Sur la Figure IV.18, est représentée l'évolution du signal de fluorescence lors de l'injection de la cible à une concentration de 10 ng/mL et à une concentration de 100 ng/mL pour un débit de 50 µL/min. Le seuil Sbf calculé est également représenté en pointillé en rouge. Dans ce cas de figure, ce sont les données sans soustraction du bruit de fond local mais avec normalisation qui sont présentées.

Pour la concentration de 100 ng/mL, le signal de fluorescence dépasse strictement le seuil après 6 min d'injection. Le système optofluidique devrait donc pouvoir détecter cette concentration dans ces conditions expérimentales. Pour la concentration de 10 ng/mL, on remarque qu'il faut au moins 18 minutes d'injection de la cible pour que le signal de fluorescence moyen dépasse le seuil. Toutefois, les barres d'erreur restent sous cette limite, que ce soit après 18 min ou 20 min d'injection. Cela nous indique donc que pour ces paramètres, la concentration de 10 ng/mL est encore trop proche du seuil Sbf pour être considérée comme potentiellement détectable.

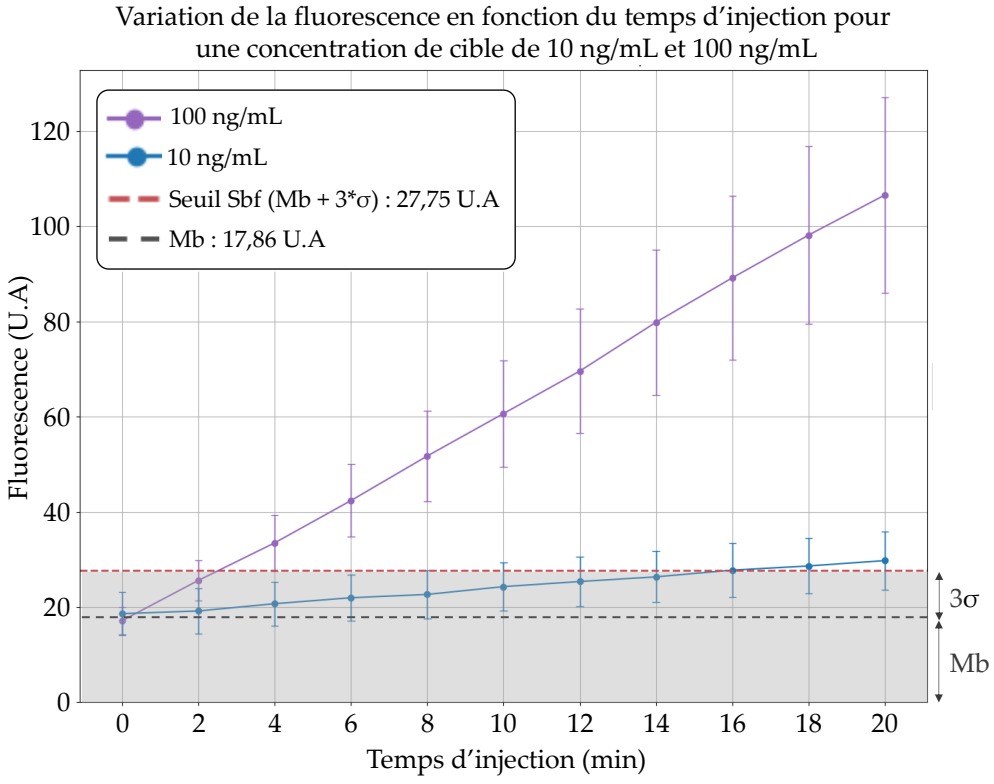


Figure IV.18 : Graphique représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du temps d'injection pour une concentration d'anticorps cibles AF488 de 10 ng/mL et de 100 ng/mL. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence dans un canal et les barres d'erreur à l'écart-type associé. En rouge est représenté le seuil de bruit de fond calculé spécifiquement pour ce test avec un temps d'intégration de 6000 ms.

Avec la plateforme optofluidique, le seuil de détection varie en fonction des paramètres expérimentaux fixés et notamment du temps d'intégration qui influence fortement le bruit de fond. Pour réussir à détecter une concentration de 10 ng/mL, il faudrait augmenter le temps d'injection de la cible pour obtenir un signal strictement supérieur au seuil de bruit de fond.

Une régression de pseudo-ordre 1 est appliquée aux courbes de fluorescence pour les deux concentrations afin d'estimer le temps d'injection nécessaire pour dépasser le seuil Sbf (Figure IV.19). Cette fois-ci, le bruit de fond local de chaque plot est soustrait des données brutes avant la normalisation, ce qui signifie que le seuil Sbf correspond à présent à trois fois l'écart-type de bruit de fond local ($3 \times \sigma$).

Les régressions d'ordre 1 appliquées ont des coefficients de détermination de 0,094 et 0,095 pour les concentrations de 100 ng/mL et 10 ng/mL respectivement. D'après ces résultats, pour une concentration à 10 ng/mL, il faudrait théoriquement entre 30 et 40 minutes d'injection d'anticorps cible pour obtenir un signal strictement supérieur au seuil Sbf.

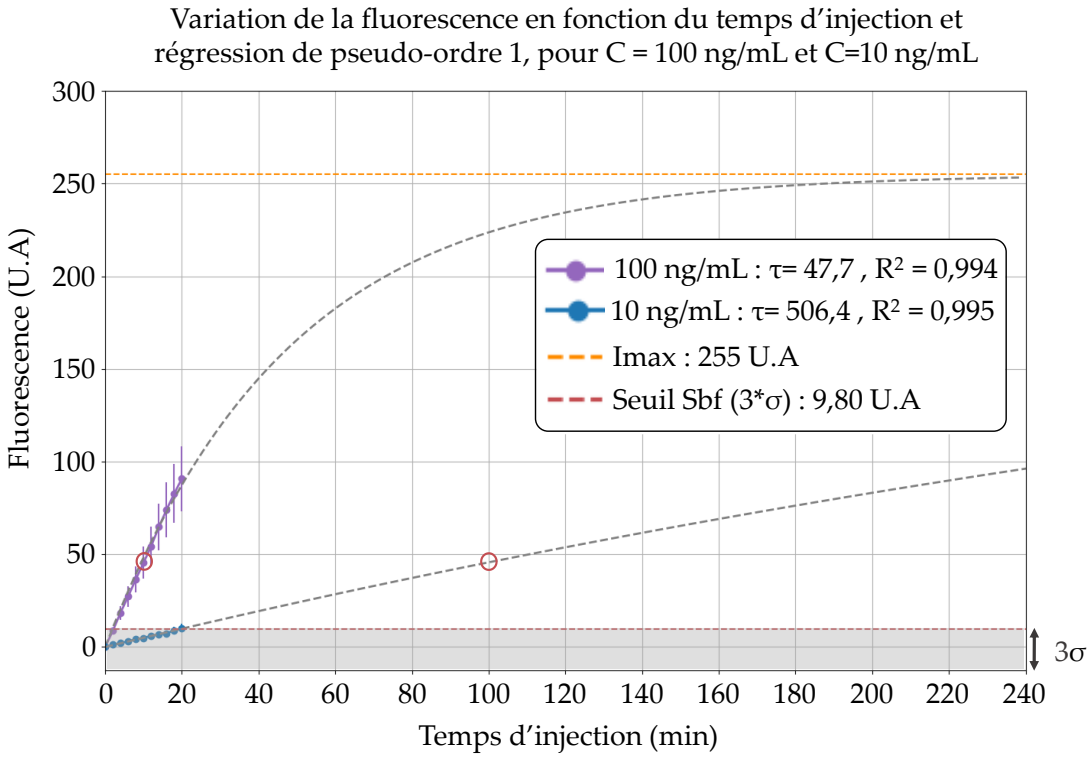


Figure IV.19 : Graphique représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du temps d'injection pour une concentration d'anticorps cible AF488 de 10 ng/mL et de 100 ng/mL. Les points correspondent aux valeurs moyennes de fluorescence dans un canal et les barres d'erreur à l'écart-type associé. Une régression de pseudo-ordre 1 est superposée pour chaque courbe et les valeurs de τ et du coefficient de détermination sont présentées en légende. Les cercles rouges et violets mettent en évidence que l'intensité de fluorescence est similaire pour 10 minutes d'injection à 100 ng/mL et 100 minutes d'injection théorique à 10 ng/mL.

De plus, le graphique montre également que les deux concentrations d'anticorps AF488 atteignent des niveaux de fluorescence similaires (~ 45 U.A) pour 10 minutes d'injection de la cible à 100 ng/mL et pour 100 minutes d'injection théorique de la cible à 10 ng/mL (cercles

rouges sur la Figure IV.19). Comme précédemment, on calcule la quantité totale de molécules injectées dans le canal pour ces deux concentrations. Ainsi, 10 minutes d'injection (500 µL) à une concentration de 100 ng/mL correspond à $2{,}01 \times 10^{11}$ molécules injectées. Pour une concentration de 10 ng/mL et un temps d'injection de 100 minutes (5 mL) estimés précédemment, la quantité de molécules injectée est théoriquement de $2{,}01 \times 10^{11}$ molécules, soit la même valeur. On peut donc supposer que, dans des conditions expérimentales identiques, un même niveau de fluorescence pour deux concentrations différentes d'anticorps anti-lapin AF488 correspond à une quantité similaire de molécules injectées. Ce résultat nous permet également de confirmer que la régression de pseudo-ordre 1 semble efficace pour estimer l'évolution de la fluorescence pour la concentration de 10 ng/mL.

En conclusion, cette plateforme optofluidique pourrait en théorie permettre de détecter une concentration d'anticorps anti-lapin AF488 de 10 ng/mL, en travaillant avec un temps d'injection compris entre 30 et 40 minutes et en conservant les autres paramètres expérimentaux.

Théoriquement, il est également possible d'augmenter le temps d'intégration du banc optique jusqu'à 14 s afin d'amplifier le signal de fluorescence. Toutefois, cette approche s'accompagne d'une augmentation de la lumière parasite et du bruit de fond.

Il est important de préciser qu'en dehors de la normalisation des données, aucun traitement supplémentaire n'a été effectué. On pourrait donc imaginer améliorer la sensibilité du système en réalisant un traitement du signal plus avancé, notamment avec une amplification numérique du signal (augmentation du contraste ou application de filtres pour accentuer le signal sur l'image finale).

IV.2.7 Discussion

Dans cette partie, l'influence des paramètres expérimentaux sur les performances du biocapteur au sein de la plateforme optofluidique a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que la plateforme était assez sensible pour détecter les variations de fluorescence dues aux changements de certains paramètres.

L'étude de l'influence de la concentration de la sonde a montré que pour une concentration de sonde de 1 mg/mL, le signal de fluorescence est 4,4 fois plus élevé qu'avec une concentration de sonde de 0,1 mg/mL. Pour ce paramètre, il aurait été intéressant de tester des concentrations intermédiaires entre 0,1 mg/mL et 1 mg/mL ou des concentrations supérieures afin d'identifier la concentration optimale permettant d'obtenir un signal suffisamment élevé, tout en utilisant moins de sondes pour réduire les coûts d'un futur biocapteur.

En ce qui concerne le volume de sonde déposé sur la surface du capteur, aucun des trois volumes étudiés (990 pL, 1650 pL et 3300 pL) n'a montré de différences significatives dans les performances de biocapture. Réaliser cette étude avec des concentrations plus faibles de biorécepteurs (ex : 0,1 mg/mL) serait intéressant pour déterminer si une augmentation du volume de sondes déposées compenserait l'utilisation de ces concentrations plus diluées.

L'influence du temps d'injection a ensuite été analysée et a mis en évidence le rôle déterminant de ce paramètre sur les performances du biocapteur. Les résultats montrent que la réponse du capteur dépend à la fois de la concentration de la cible et de la quantité totale de molécules injectées, ce qui explique qu'un signal similaire puisse être obtenu avec des conditions d'injection différentes. L'analyse cinétique confirme que l'évolution du signal suit un modèle de pseudo-premier ordre, cohérent avec une interaction de type Langmuir entre les anticorps. L'étude de l'interaction anticorps-antigène semble donc possible avec cette plateforme.

En ce qui concerne l'influence du débit, il ne semble pas y avoir de différence notable sur les performances du biocapteur pour les débits étudiés (50, 100 et 150 µL/min) et pour une concentration de cible de 1 µg/mL. D'autres tests à une concentration de 100 ng/mL ont été effectués et n'ont pas non plus donné de résultats significatifs.

Les faibles différences observées pourraient toutefois être liées à un manque de sensibilité de la plateforme optofluidique, notamment vis-à-vis du système optique qui ne fonctionne qu'en 8 bits, offrant seulement 256 niveaux d'intensité. Afin de confirmer ou d'infirmer les tendances observées, il serait pertinent de réaliser une nouvelle série d'expérimentations en incluant des duplicats ou triplicats intra-capteur pour chaque condition de débit et avec une gamme de concentrations pour des valeurs inférieures ou égales à 1 µg/mL.

Rappelons également que l'actionnement fluidique en flux continu étant sensible aux bulles d'air à des débits inférieurs à 50 µL/min, nous n'avons pas pu étudier les débits utilisés dans la littérature (< 35 µL/min). En effet, malgré une étape de purge, certaines bulles peuvent se retrouver piégées dans le tube de sortie, entrainant un arrêt du flux (chapitre III). Ce phénomène s'est produit à plusieurs reprises pour un débit de 50 µL/min, ce qui limite l'utilisation de faibles débits avec cette méthode. Il serait néanmoins intéressant d'étendre la gamme de débit en incluant des débits plus proches de la littérature (10 µL/min, 25 µL/min) ainsi que des débits plus élevés (200 µL/min et 250 µL/min), mais également des essais avec incubation de la cible (0 µL/min) pour réaliser une étude plus complète sur ce paramètre.

En ajustant les paramètres expérimentaux, principalement le temps d'injection (20 min) et le temps d'intégration (6000 ms), la concentration de 100 ng/mL d'anticorps cibles AF488 a pu être détectée au-delà du seuil du bruit de fond du système optofluidique. Ces paramètres expérimentaux n'ont cependant pas permis de détecter la concentration de 10 ng/mL. Une marge de manœuvre est encore possible pour détecter cette concentration en augmentant le temps d'injection et le temps d'intégration. Avec les régressions de pseudo-ordre 1, nous avons notamment déduit qu'il faudrait théoriquement un temps d'injection supérieur à 30 minutes pour que le niveau de fluorescence de cette concentration dépasse le seuil du bruit de fond. Des expérimentations supplémentaires devraient donc être réalisées pour tenter de détecter cette concentration en ajoutant les contrôles négatifs nécessaires à la validation de la limite de détection et de la limite de quantification. Cette partie a donc mis en évidence l'importance d'optimiser les paramètres expérimentaux pour maximiser les performances des biocapteurs.

À présent, comparons les performances de la plateforme à d'autres systèmes de la littérature cherchant à détecter des anticorps IgG. Quatre systèmes ont été sélectionnés et les informations correspondantes à leurs performances sont présentées dans le Tableau IV-9 :

Méthode de détection	Concentration des anticorps injectés	Débit	Durée d'injection	Volume injecté	Références
Immunocapteur à spectroscopie de réflectance en lumière blanche	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin 10 µg/mL	20 µL/min	20 min	400 µL	[166]
SPR	Anticorps polyclonaux anti-SARS-Cov2 100 ng/mL	15 µL/min	6 min 40	100 µL	[172]
LSPR	Anticorps anti-SARS-Cov2 1 ng/mL	30 µL/min	20 min	600 µL	[173]
Mach-Zehnder	Anticorps Lapin polyclonaux anti-AFM1 1 µg/mL	35 µL/min	Environ 5 min	200µL	[174]

Tableau IV-9 : Plateformes de détection d'anticorps IgG.

Pour évaluer les performances de notre plateforme par rapport aux quatre autres systèmes, nous avons comparé trois critères : la sensibilité, la rapidité d'analyse et la consommation d'échantillon. Pour permettre une comparaison directe, chacun de ces critères a été normalisé sur une échelle de 0 à 1. Pour chaque critère, la meilleure performance observée a été ramenée à 1 et la moins bonne à 0. La représentation radar (Figure IV.20) permet de visualiser le profil des performances et montre que notre plateforme optofluidique présente un profil équilibré avec des performances intermédiaires proches des profils des capteurs LSPR et SPR. Notre plateforme est donc compétitive avec les autres systèmes de la littérature et offre un compromis performant entre vitesse, sensibilité et faible volume d'échantillon,

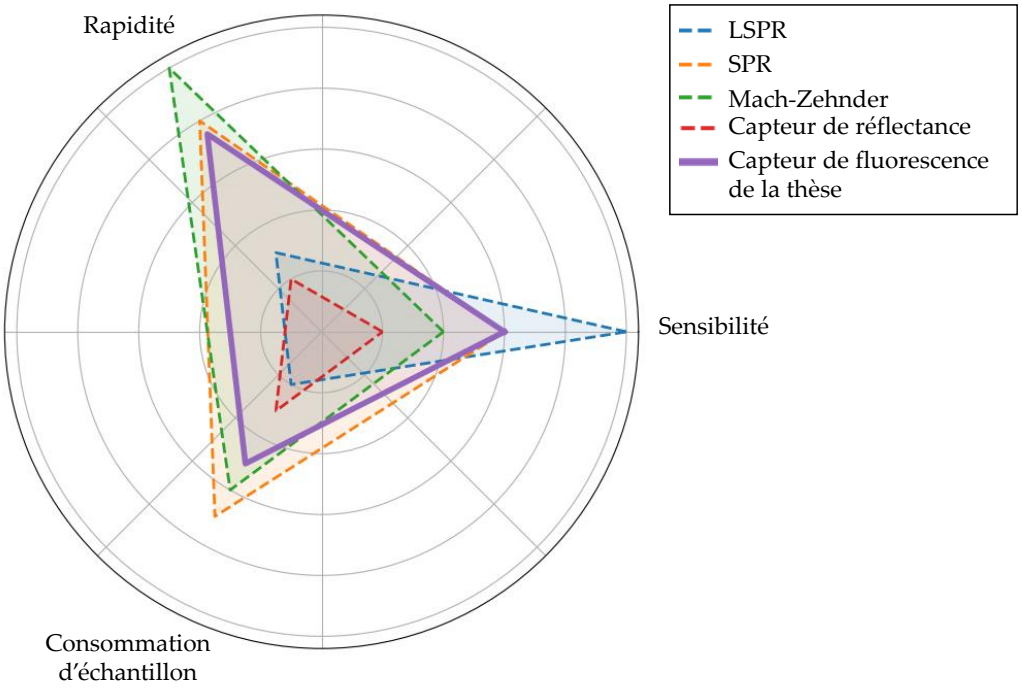


Figure IV.20 : Représentation radar des performances de chaque système pour les comparer.

À travers tous ces tests, nous avons pu également valider les performances de la cartouche optofluidique avec son intégration modulaire et valider la possibilité de réaliser des tests semi-automatiques. En effet, l'automatisation du système reste limitée notamment par l'étape de purge, avant utilisation de la cartouche, car elle est effectuée manuellement pour s'assurer que les canaux sont correctement purgés. De plus, le remplissage ou la vidange des réservoirs d'entrée sont également réalisés à la main. Pour ce dernier point, l'utilisation d'un robot de pipetage permettrait son automatisation. Il est également nécessaire d'être présent en continu lors de l'expérimentation pour s'assurer de la stabilité du flux. En effet, malgré les précautions mises en place pour éviter la formation de bulles, l'actionnement fluidique a montré ses limitations. À de nombreuses reprises, des expérimentations ont été perturbées par l'interruption du flux, entraînant l'invalidation de ces essais. La stabilité du débit est en effet cruciale même si l'influence de celui-ci sur les résultats semble limitée. Une autre solution d'aspiration comme une pompe seringue ou une pompe péristaltique pourrait être envisagée pour étudier ce paramètre avec la plateforme.

Il serait également intéressant d'évaluer si la plateforme permet une détection quantitative. Pour cela, il faudrait réaliser une gamme étalon pour déterminer si l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration injectée. En fluorescence, cette approche nécessite de travailler avec une gamme resserrée pour éviter que les concentrations les plus fortes saturent (par exemple 100, 200, 300 et 400 ng/mL). En effet, si l'on superpose les concentrations étudiées sur la Figure IV.21, nous pouvons observer que grâce au paramètre du temps d'intégration, nous pouvons travailler sur une large gamme de concentrations. Théoriquement, l'utilisation de la fluorescence comme méthode de transduction devrait permettre une détection semi-quantitative. La gamme étalon ne doit cependant pas être trop rapprochée pour éviter la superposition des barres d'erreur des résultats.

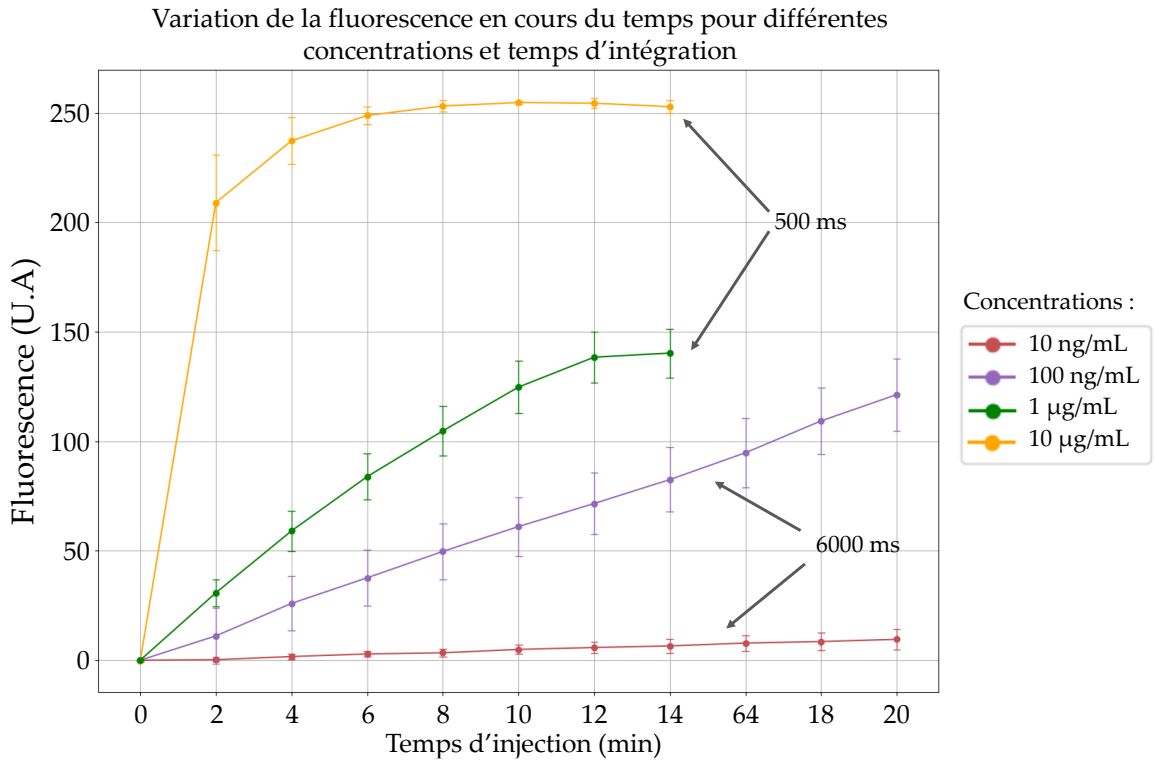


Figure IV.21 : Graphique compilant toutes les concentrations d'anticorps cible AF488 détectées en fonction du temps d'intégration appliqué et pour un débit de 50 µL/min.

La méthode de normalisation utilisée pour analyser les résultats est basée sur l'utilisation d'une zone témoin stable comme référence. Elle a été mise en place après l'observation d'une instabilité des signaux de fluorescence, liée à un dysfonctionnement de communication entre le logiciel Uflu et le banc optique. Comme illustré dans le chapitre II, les analyses effectuées automatiquement n'assurent pas le respect de la consigne de temps d'intégration, celui-ci pouvant varier fortement d'une image à une autre. Ce problème, particulièrement visible avec des temps d'intégration élevés (> 2 s), a été identifié a posteriori.

Bien que cette méthode permette de remettre à niveau des images présentant la même fluorescence, elle comporte plusieurs limitations, liées au choix de la zone témoin. En effet, cette zone témoin n'a pas pu être identique pour toutes les expérimentations. Les premiers tests ont été réalisés avec la cartouche avec une fenêtre d'observation en COC, tandis que les suivants avec une fenêtre en verre. Les régions émettant de la lumière parasite, après excitation par la lumière bleue, sont finalement devenues nos zones témoins, notamment avec l'auto-fluorescence stable de la membrane élastique. Comme la zone témoin n'a pas été déterminée en amont des expérimentations, il n'est pas possible de comparer toutes les études entre elles à partir d'une même référence standardisée.

Idéalement, il faudrait trouver un matériau autofluorescent stable sur une grande plage de temps d'intégration, car celui-ci ne doit pas saturer. Des essais de dépôt d'anticorps fluorescents directement sur la surface du biocapteur ont été menés. Cependant, même avec une concentration de 1 mg/mL, ces plots fluorescents ne sont détectables qu'à de très forts temps d'intégration (> 4 s), probablement à cause des étapes de lavage lors de la fabrication du biocapteur. Une étude complémentaire est donc nécessaire pour identifier un matériau de

référence adapté et facilement intégrable dans la zone d'illumination de la cartouche microfluidique. Par exemple, une pastille autofluorescente, dont la fluorescence ne varie pas au cours du temps, pourrait être une solution à envisager.

En l'absence d'une référence commune pour l'ensemble des expérimentations, l'interprétation des résultats entre deux tests différents s'est basée sur une étude relative des variations pour évaluer l'influence de certains paramètres sur les performances du biocapteur.

Finalement, cette première étude a permis de mettre au point le protocole fluidique, de prendre en main la plateforme et d'évaluer les performances et les limites du système. Sur cette base, des essais préliminaires de détection de l'insuline ont été menés et sont présentés dans la section suivante.

IV.3 Détection d'insuline pour le suivi d'un organoïde de pancréas

La plateforme optofluidique a été validée avec le couple modèle anticorps lapin et anti-lapin AF488, ce qui a permis d'établir et de valider un protocole microfluidique de biodétection et d'identifier les limites de cette cartouche. En s'appuyant sur les résultats de l'étude précédente, cette partie s'intéresse à la détection d'insuline à l'aide de la plateforme optofluidique.

IV.3.1 Contexte en laboratoire : analyse des sécrétions d'insuline d'un organoïde de pancréas pour l'étude du diabète de type 1

Comme expliqué dans le chapitre I, les biologistes du laboratoire LSMB au CEA Leti, en collaboration avec le laboratoire Biomics du CEA Irig, travaillent sur la culture de modèles « d'organoïdes » de pancréas. Ils cherchent à développer des modèles stables pour l'étude du diabète de type 1, maladie auto-immune où le système immunitaire détruit les cellules β du pancréas. Ces cellules sont les seules capables de produire de l'insuline, l'hormone qui permet au glucose ingéré de quitter le sang pour entrer dans les cellules et produire de l'énergie. Sans cette régulation, le glucose reste dans le sang et provoque chez le patient une hyperglycémie.

Dans le pancréas, ce sont les îlots de Langerhans qui produisent l'insuline et correspondent en réalité au modèle des « organoïdes » de pancréas utilisés au laboratoire.

Pour évaluer la qualité d'un organoïde de pancréas, un test GSIS (Glucose-Stimulated Insulin Secretion) est réalisé sur les modèles étudiés. Ce test permet de mesurer la capacité d'un organoïde à sécréter de l'insuline après une stimulation au glucose. Pour cela, l'organoïde est exposé successivement à des milieux plus ou moins concentrés en glucose. En laboratoire, ce test d'insulino-sécrétion dure entre 3 h et 5 h.

Le protocole comprend les étapes suivantes :

- 1 heure de pré-incubation « Low Glucose » (LG) avec une solution de glucose à une concentration de 2,8 mM.

- 1 heure d'exposition au LG à 2,8 mM en flux continu avec récupération des surnageants pour les stocker à -20°.

- 1 heure d'exposition au « High Glucose » (HG) à une concentration de 16,7 mM avec récupération des surnageants pour les stocker à -20°.

Les sécrétions d'insuline sont ensuite dosées à partir de kits ELISA (STELLUX ALPCO) dont la gamme de quantification est entre 5 pg/mL et 30 000 pg/mL. La concentration d'insuline sécrétée en « Low Glucose » ou « High Glucose » dépend du modèle analysé, les pseudo-ilots sécrétant moins que des ilots natifs. La concentration d'insuline récupérée dans le surnageant après la stimulation « Low Glucose » varie fortement entre les modèles étudiés. D'après les résultats obtenus au laboratoire, la concentration la plus faible relevée est de 286 pg/mL (ou 49 pM) pour un volume d'environ 100 µL de surnageant.

Le dosage ELISA utilisé pour quantifier les sécrétions d'insuline est une méthode robuste, sensible et largement employée en routine dans les laboratoires de biologie. Cependant, pour l'étude des organoïdes de pancréas, cette méthode ne permet pas un suivi multipoints ou en temps réel de la dynamique des sécrétions, requiert de nombreuses étapes manuelles (incubations, lavages, lecture) et est chronophage pour les biologistes. L'automatisation d'un test GSIS est donc pertinente pour améliorer l'étude de ces modèles.

IV.3.2 Intégration d'un protocole d'immunodosage « sandwich »

Le système optofluidique intègre actuellement un biocapteur nécessitant l'utilisation de marqueurs fluorescents. La détection d'une cible non fluorescente repose donc sur un immunodosage de type sandwich utilisant un anticorps secondaire conjugué à un marqueur fluorescent.

i. Protocole d'immunodosage « sandwich » en cartouche microfluidique

Pour détecter une cible non marquée, une détection en « sandwich » doit être mise en place, ce qui implique d'adapter le protocole fluidique utilisé précédemment. La détection en sandwich consiste à travailler avec un anticorps de capture comme biorécepteur et un anticorps secondaire fluorescent comme élément de détection.

Les étapes du protocole d'immuno-sandwich pour un canal sont présentées sur la Figure IV.22 et sont décrites ci-dessous :

- Étape 1 : Injection de l'échantillon contenant l'insuline dans le canal pendant une durée et à un débit prédéterminés.

- Étape 2 : Lavage du canal avec une solution de PBS 1X à un débit de 400 µL/min pendant 1 min.

- Étape 3 : Injection de l'échantillon contenant l'anticorps secondaire fluorescent dans le canal pendant une durée et à un débit prédéterminés.

- Étape 4 : Lavage du canal avec une solution de PBS 1X à un débit de 400 µL/min pendant 1 min.

- Étape 5 : Acquisition d'une image de la zone de détection. Pendant cette prise de vue, du PBS 1X est injecté à un débit de 400 µL/min dans le canal inférieur de purge, pour prévenir la formation de bulles d'air dans le tube de sortie.

Le code Python a été adapté à ce protocole (Annexe M).

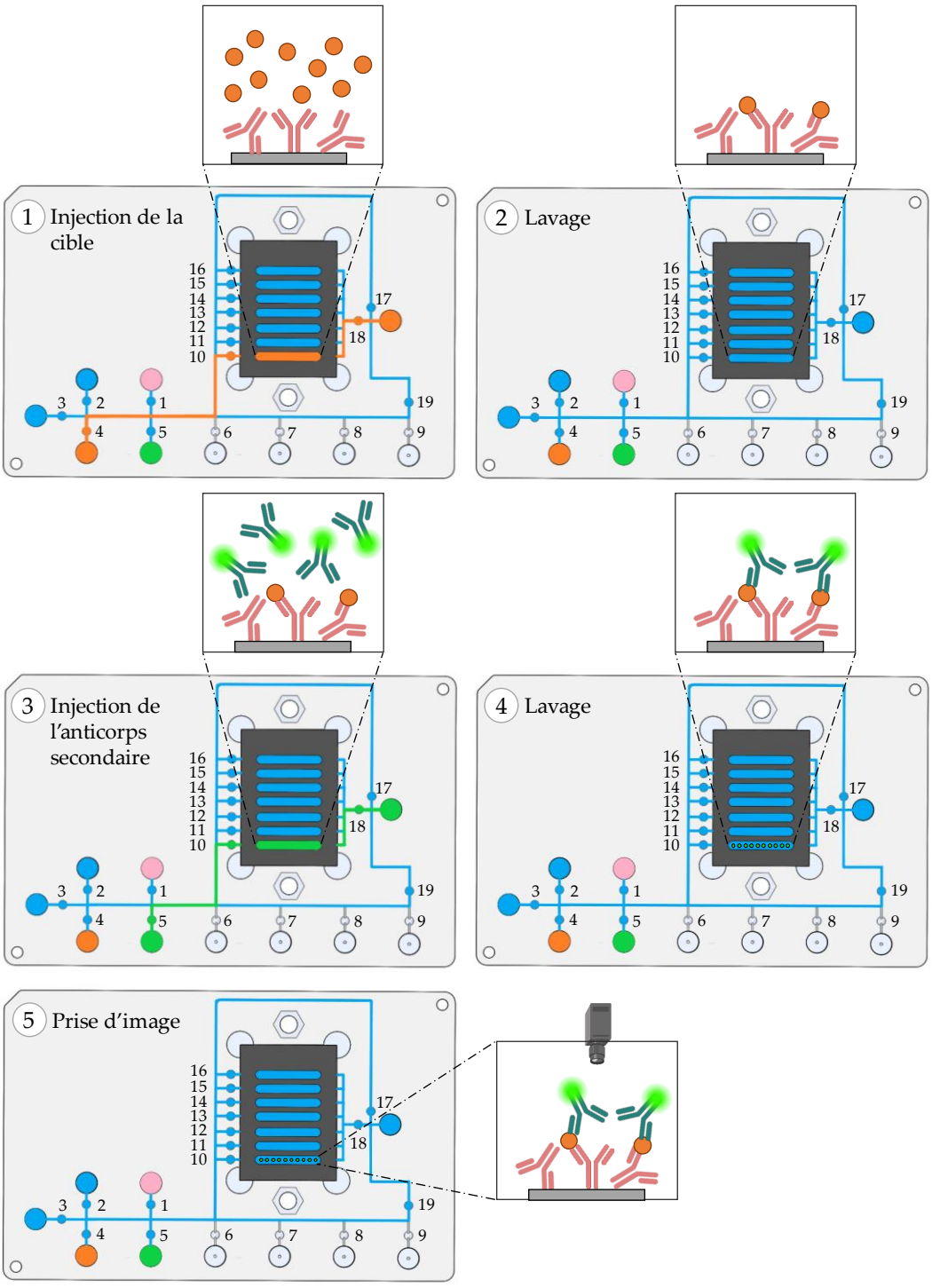


Figure IV.22 : Étapes du protocole d'immuno-sandwich, (1) : injection de l'insuline, (2) lavage du canal au PBS 1X, (3), injection de l'anticorps secondaire de détection, (4) lavage du canal au PBS 1X, (5) acquisition d'une image du canal.

ii. Détection d'insuline avec le système optofluidique

Pour réaliser le protocole de biodétection de l'insuline, une paire d'anticorps spécifiques à l'insuline a été sélectionnée et de l'insuline en poudre a été utilisée. Les informations complémentaires sont détaillées en Annexe N. Les étapes du protocole de biodétection sont les suivantes :

- Injection de l'insuline pendant 15 min à un débit de 100 µL/min.
- Rinçage au PBS 1X pendant 1 min à un débit de 100 µL/min.

Puis pour 6 cycles :

- Injection de l'anticorps secondaire fluorescent (HM604) à une concentration de 10 µg/mL (66,7 nM) pendant 1 min, soit 100 µL d'échantillon injectés ($4{,}02 \times 10^{12}$ molécules d'anticorps secondaire).
- Rinçage au PBS 1X pendant 1 min à un débit de 400 µL/min.

Deux concentrations en insuline ont été testées : 1 µg/mL (167 nM) et 100 ng/mL (16,7 nM) avec la cartouche composée d'une fenêtre en verre. Les résultats de fluorescence ont été normalisés avec la méthode présentée dans le chapitre II.

- **Résultats à 1 µg/mL (167 nM)**

D'après la Figure IV.23, le signal de fluorescence augmente au cours du temps bien qu'il reste faible (< 20 U.A). Des plots de PBS 1X ont été déposés sur la surface du capteur comme contrôle dans le canal. À la fin de l'immunosandwich, le rapport signal sur bruit (S/B) pour les plots de PBS est de 1,06, indiquant qu'aucune interaction n'a eu lieu (Figure IV.23.A). Pour les plots de détection, le rapport signal sur bruit est de 2,8, ce qui signifie que l'intensité mesurée est nettement supérieure au bruit de fond local et qu'un signal spécifique a bien été détecté par l'anticorps secondaire AF488 (Figure IV.23.A). La fluorescence observée dépasse presque d'un facteur 3 le contrôle négatif au PBS du canal. Les anticorps primaire et secondaire utilisés pour réaliser l'immunosandwich ont été spécialement développés pour réaliser des tests ELISA. Nous pouvons donc supposer que le complexe insuline/anticorps de détection AF488 s'est bien formé de manière spécifique sur les plots de reconnaissance contenant les anticorps de capture. Pour confirmer ces résultats, il faudrait tout de même réaliser une étude de la spécificité du couple d'anticorps avec l'insuline, notamment en effectuant dans un canal l'injection de l'anticorps secondaire AF488 seul et dans un autre un immunosandwich avec des anticorps non spécifiques à l'insuline.

De plus, l'évolution de la fluorescence au cours du temps (Figure IV.23.b) nous montre que la quantité d'anticorps de détection n'est pas saturée. Idéalement, il aurait fallu que la concentration molaire d'anticorps secondaire soit dix fois supérieure à la concentration molaire de l'insuline pour être dans des conditions où l'anticorps secondaire est saturé par rapport à la cible, ce qui n'est pas le cas ici. L'étude de la spécificité du couple d'anticorps avec l'insuline n'a également pas pu être effectuée lors de ce test.

Ce premier test est un résultat préliminaire à interpréter avec prudence, notamment car l'insuline, à une concentration de 1 µg/mL, a été utilisée dans la solution tampon de dissolution à pH 2,5. Cet environnement fortement acide est incompatible avec une immunodétection fiable car les fonctions chimiques sont protonées, ce qui perturbe les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène impliquées dans la formation de complexe anticorps-antigène. Un pH physiologique compris entre 7,35 et 7,45 est donc préférable.

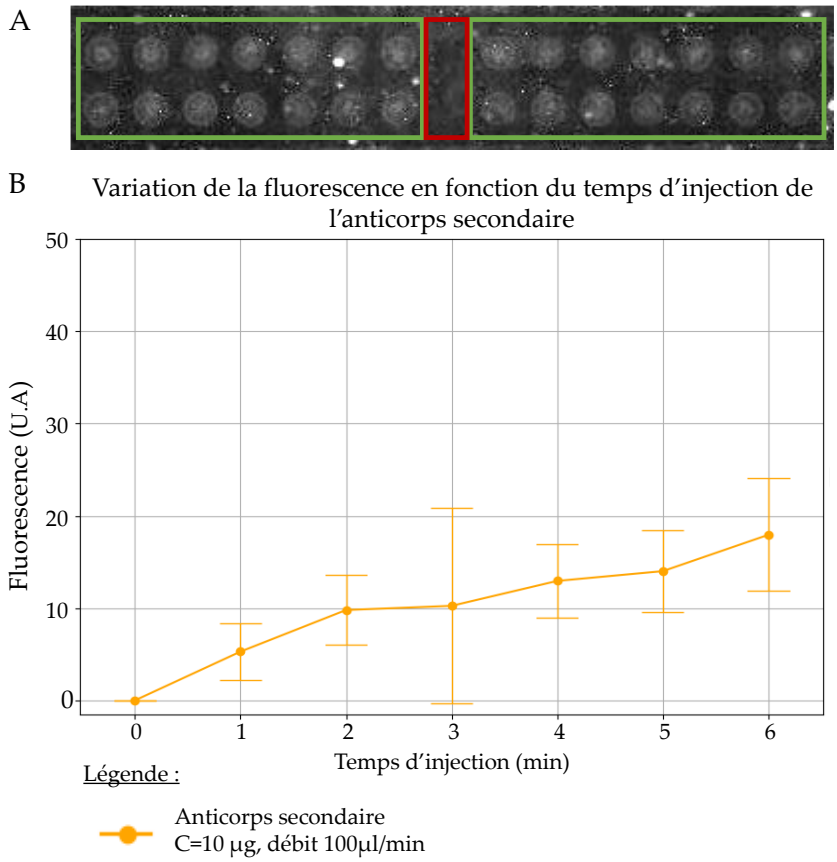


Figure IV.23 : Résultats de l'immunosandwich pour détecter 1 µg/mL d'insuline, A – Photographie du canal avec les plots fluorescents en vert et les plots de PBS 1X en rouge, B-Graphique représentant la variation de la fluorescence en fonction du temps d'injection de l'anticorps secondaire pour un temps d'intégration de 6000 ms.

- **Résultats à 100 ng/mL**

Pour obtenir une solution à 100 ng/mL, la solution précédente à 1 µg/mL a été diluée dans de l'eau déionisée. On obtient donc une solution à un pH 7,5. Le protocole est le même que précédemment, mais seulement 3 cycles d'injection ont été effectués pour l'anticorps secondaire. Lors de ce test, on observe des traces blanches tout au long du canal (Figure IV.24). Même après plusieurs lavages, les traces ne disparaissent pas. Ce résultat provient probablement du changement de pH de la solution d'insuline, qui atteint une valeur de 7,5 après dilution à 100 ng/mL. Ce nouvel environnement n'étant pas compatible avec la solubilisation de l'insuline utilisée, cela favorise sa réagrégation. Ce phénomène est visible à l'œil nu dans l'Eppendorf contenant l'échantillon. À la suite de ces résultats, des tests ont été réalisés pour éviter cette réagrégation, mais aucun n'a permis d'obtenir une solution d'insuline dissoute à un pH supérieur à 3.

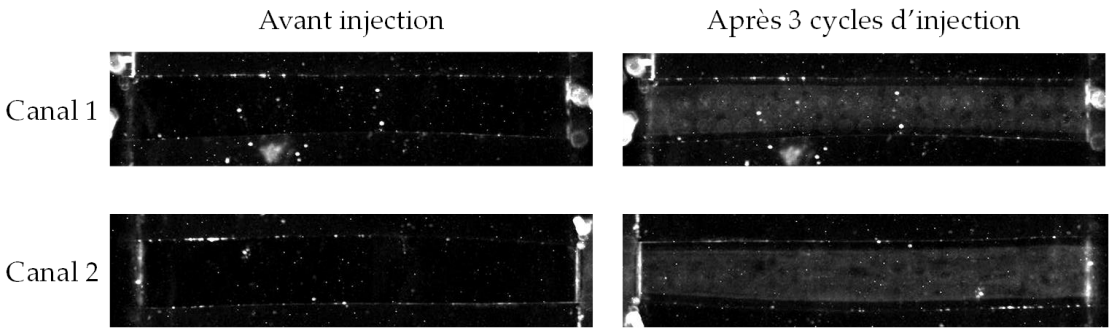


Figure IV.24 : Photographies des deux canaux n° 1 et n° 2 avant injection de l'anticorps secondaire de détection et après 3 cycles d'injection. Des traces blanches apparaissent le long du canal après injection de l'anticorps et après plusieurs lavages.

IV.3.3 Discussion

Ces tests préliminaires ont mis en évidence l'importance de la solution tampon dans la réalisation d'essais biologiques. Bien que l'immunosandwich semble fonctionnel, les conditions actuelles ne permettent pas de conclure sur l'efficacité des tests. Par manque de temps, il n'a pas été possible de réaliser d'autres essais avec une solution d'insuline commerciale au pH approprié, avec des biocapteurs fonctionnalisés par silanisation en phase gazeuse.

L'insuline commerciale a été privilégiée, dans un premier temps, afin de garantir un contrôle précis des concentrations et des volumes testés, mais aussi pour valider le couple d'anticorps sélectionnés. Utiliser des sécrétions d'insuline issues d'organoïdes de pancréas reste un véritable défi. En effet, les concentrations de sécrétions mesurées sont particulièrement basses, notamment après une stimulation « Low Glucose » (286 pg/mL, soit environ 49 pM), et les volumes d'échantillons sont également très limités (environ 100 µL).

De telles contraintes imposeraient de travailler à des débits beaucoup plus faibles, voire de privilégier des protocoles par incubation statique. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps secondaires de détection constitue également une limitation, puisqu'elle nécessite une étape préalable de modification à l'aide de kits spécifiques, entraînant une complexification du protocole et une augmentation des coûts de détection. Pour une plateforme intégrant à la fois la culture d'un organoïde ainsi que la détection et la quantification, l'utilisation de biocapteurs sans marquage (cristaux photoniques, interféromètres) serait donc un atout pour éviter certains de ces inconvénients. La méthode actuelle d'actionnement du flux présente également plusieurs limitations, notamment une plage de fonctionnement limitée, son manque de robustesse face aux bulles d'air et son incompatibilité avec la parallélisation de cultures d'organoïdes dans une même cartouche.

Ainsi, bien que ces premiers essais ne permettent pas de valider formellement l'immunosandwich développé, les résultats obtenus restent tout de même encourageants car nous avons pu établir un protocole fluidique pour la détection de biomolécules non fluorescentes à partir d'un immunosandwich, ce qui constitue une base prometteuse pour la poursuite et l'optimisation des travaux futurs.

Résumé du Chapitre IV

- L'élaboration du protocole de biodétection en microfluidique a été décrite en détaillant les méthodes mises en œuvre pour éviter l'apparition de bulles d'air puis les étapes du protocole, incluant la passivation, l'injection de l'échantillon, les étapes de lavage et l'acquisition des données.

- Une étude de la reproductibilité intra et inter-capteurs a été réalisée pour évaluer la plateforme optofluidique. Les résultats montrent une bonne reproductibilité intra et intercanaux (respectivement CV ≤ 11,3 % et CV ≤ 12,4 %). La reproductibilité inter-capteurs est également satisfaisante entre les deux séries étudiées (CV ≤ 10,8 %).

- L'étude de certains paramètres expérimentaux a mis en évidence leur impact sur les performances du biocapteur, en particulier la concentration de la sonde et le temps d'injection. En revanche, les variations de débits n'ont pas montré de différence suffisamment marquée pour confirmer l'influence de ce paramètre.

- En considérant le seuil de détection comme la moyenne du bruit de fond local additionnée à 3 fois son écart-type, la plateforme est capable de détecter efficacement la concentration de 100 ng/mL d'anticorps anti-lapin fluorescents. Pour une concentration de 10 ng/mL, les résultats se situent à la limite des capacités de détection de la plateforme, dans les conditions expérimentales suivantes : 6000 ms d'intégration, une concentration de sonde de 1 mg/mL, un débit de 50 µL/min et un temps d'injection de 20 min.

- Un premier essai de détection d'insuline a montré la faisabilité d'une détection par immunosandwich sans la valider totalement et a mis en évidence l'importance du choix de la solution tampon dans la réalisation d'essais biologiques fonctionnels.

Chapitre V

Vers une fonctionnalisation de surface verte et orientée

Introduction

Ce chapitre V est consacré au développement d'un nouveau protocole de fonctionnalisation de surface éco-responsable. Dans un premier temps, une étude bibliographique portant sur l'influence des paramètres réactionnels sur la réaction de silanisation est présentée pour justifier et introduire le protocole de silanisation éco-responsable élaboré au cours de cette thèse et du stage d'Yvana Kouatche. Ce protocole est ensuite couplé à une réaction de chimie click en condition douce pour effectuer l'immobilisation orientée des anticorps à la surface du biocapteur. Cette réaction est biocompatible et peut être réalisée dans des solvants à faible impact environnemental, ce qui est cohérent avec l'approche de silanisation éco-responsable. Les résultats de caractérisation des surfaces fonctionnalisées et les premiers tests de biocapture sont présentés et discutés en dernière partie.

V.1 Fonctionnalisation de surfaces en phase liquide : silanisation éco-responsable

V.1.1 Fonctionnalisation de surface par silanisation

i. Les organosilanes

La modification de la surface d'un substrat inorganique, appelée fonctionnalisation, peut être réalisée avec la formation de monocouches auto-assemblées de molécules (SAMs pour Self-assembled monolayers) créant une liaison covalente entre le substrat et la molécule d'intérêt. Il existe différentes méthodes pour former des SAMs. Pour des surfaces inorganiques présentant une couche d'oxyde (TiO_2, SiO_2, ZrO_2, etc.), la fonctionnalisation avec des organosilanes, appelée silanisation de surface, est une technique très utilisée dans différentes applications (coating, couche adhésive, agent de couplage, réticulant). Dans le cas de SiO_2, des groupements hydroxyles accessibles appelés silanols (Si-OH) doivent être présents à la surface pour réagir avec les organosilanes.

Un organosilane est une molécule de la classe des composés organiques de silicium, de formule chimique $YR_nSiX_{(4-n)}$,où $0 \leq n < 4$, avec [184] :

- R_n un groupement organique non hydrolysable tel qu'un groupement alkyle ou une chaîne de polyéthylène glycol (PEG). Il peut être également lié à des groupements organofonctionnels non hydrolysables Y, tels que les groupements amine ($-NH_2$) ou carboxyle (-COOH), capables de réagir avec d'autres fonctions.

- X un groupement hydrolysable (alcoxyle, halogénure ou carboxylate) qui peut réagir avec des substrats organiques et inorganiques ou avec lui-même et d'autres silanes. Les plus fréquemment utilisés sont les groupes méthoxy ($-OCH_3$) ou éthoxy ($-OC_2H_5$), qui réagissent avec les différentes formes de groupes hydroxyles et libèrent du méthanol ou de l'éthanol.

La fonctionnalisation d'organosilanes avec un substrat inorganique dépend de ses composants $X_{(4-n)}$ facilement hydrolysables. On pourra donc retrouver des organosilanes monofonctionnels (X_1), bifonctionnels (X_2) ou trifonctionnels (X_3) (Figure V.1). Un monoalkoxysilane réagira pour former une monocouche alors qu'un di- ou trialkoxysilane formeront plus facilement des multicouches.

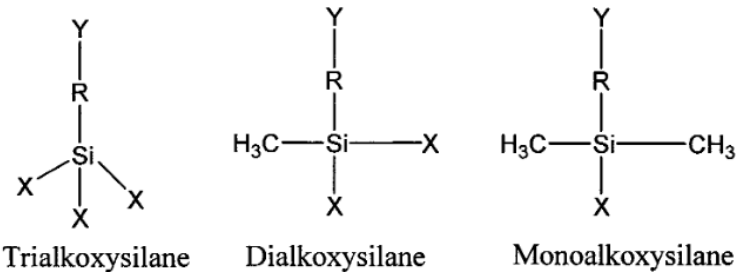


Figure V.1 : Structures génériques d'organosilanes fonctionnels avec différents nombres de substituants hydrolysables sur le silicium. [185]

ii. Réaction de silanisation sur un substrat

La formation de liaisons covalentes sur une surface hydroxylée avec des organosilanes est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, un organosilane avec un groupement alcoxy va réagir avec une molécule d'H_2O pour former une fonction Si-OH. Cette réaction s'appelle l'hydrolyse et forme des groupements silanols avec les organo-alcoxysilanes (Figure V.2.1). Par la suite, un phénomène de condensation a lieu, aboutissant à la formation d'une liaison siloxane Si-O-Si soit par la réaction entre deux silanols qui formeront un oligomère et une molécule d'eau (oxolation) (Figure V.2.2), soit par la réaction entre un silanol et un groupement alcoxyle qui formeront un oligomère et une fonction alcool (alcoxolation) (Figure V.2.3), [186], [187]. Il existe deux types de condensations : l'homocondensation, réaction se produisant entre deux organosilanes, et l'hétérocondensation, réaction entre un silanol de l'organosilane et un groupement hydroxyle présent à la surface du substrat, permettant l'immobilisation de l'organosilane sur la surface.

1. Hydrolysis and re-esterification:

$$\equiv\text{Si-O-R} + H_2O \rightarrow \equiv\text{Si-OH} + \text{HO-R}$$

$$\equiv\text{Si-OH} + \text{HO-R}' \rightarrow \equiv\text{Si-OR}' + H_2O$$

2. Condensation by producing water:

$$\equiv\text{Si-OH} + \text{HO-Si}\equiv \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}\equiv + H_2O$$

3. Condensation by producing alcohol:

$$\equiv\text{Si-OH} + \text{HO-Si}\equiv \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}\equiv + \text{HO-R}$$

Figure V.2 : Réaction d'hydrolyse et de condensation des organosilanes [186].

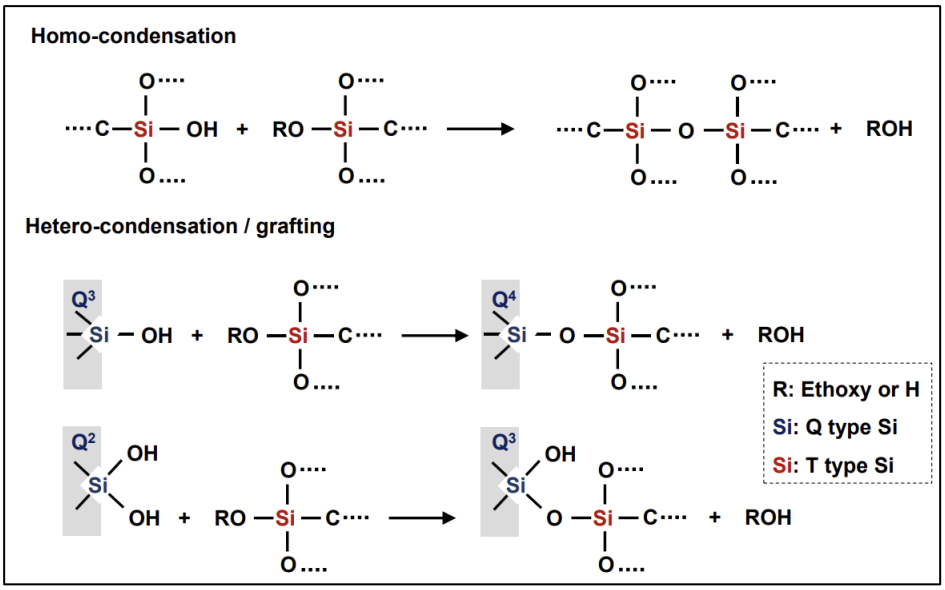


Figure V.3 : Réaction d'hétérocondensation à la surface d'un substrat oxydé [188].

Dans l'idéal, l'hydrolyse suivie de l'hétérocondensation permettent la formation d'une monocouche de silanes à la surface du substrat. Prenons l'exemple du (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). Dans un premier temps, l'APTES est hydrolysé puis réagit par hétérocondensation avec une surface d'oxyde hydroxylée. Cette réaction va permettre la formation d'une monocouche de silanes avec une amine disponible en bout de chaîne, comme représentée Figure V.4.A

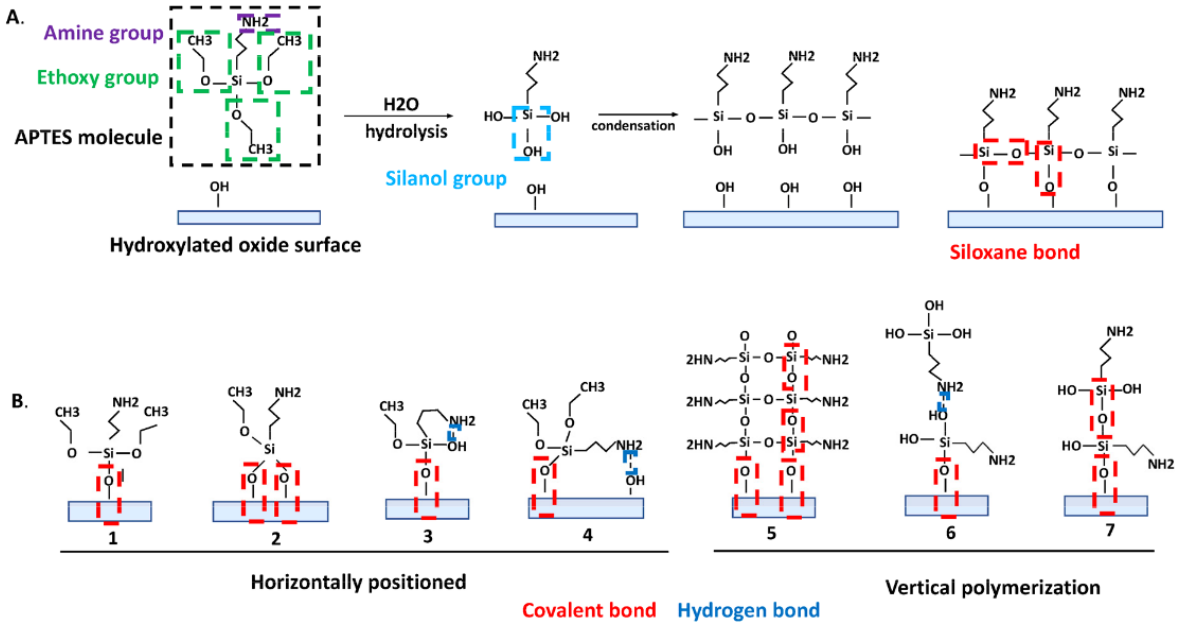


Figure V.4 : Représentation schématique, A- de la réaction de l'APTES avec une surface hydroxylée dans le cadre d'une formation d'une monocouche, B- des différentes réactions possibles impliquées dans le greffage de l'APTES sur une surface hydroxylée [189].

Cependant, l'APTES étant un silane trifonctionnel, il peut polymériser selon différentes orientations (horizontale ou verticale, Figure V.4) ou bien former des liaisons hydrogène

(Figure V.4.B). Ces différentes configurations sont dues à l'influence de nombreux paramètres réactionnels pendant la réaction de silanisation tels que l'activation de la surface, la quantité d'eau dans le solvant, la nature du solvant, la concentration en silanes, etc.

V.1.2 Paramètres réactionnels influençant la réaction de silanisation par voie liquide

i. Activation de la surface

L'activation de la surface est réalisée avant la réaction de silanisation, afin de nettoyer la surface de toute contamination organique et de générer une densité de groupements hydroxyles (-OH) réactifs sur la surface du substrat [190]. Il existe plusieurs méthodes d'activation utilisant des procédés chimiques humides avec des solutions acides fortement oxydantes telles que le piranha (70 % d'acide sulfurique (H2SO4) et 30 % de peroxyde d'hydrogène) ou les chromates hexavalents dans de l'acide sulfurique concentré. Ces solutions génèrent des groupes silanols grâce à l'action catalytique des protons H_3O^+ dans les milieux acides. Considérées comme agressives, ces solutions doivent être manipulées avec précautions de par leur dangerosité [191]. Le nettoyage au plasma oxygène ou à l'UV-ozone sont des procédés à sec très utilisés sur des durées variant entre quelques secondes à 10 min et de 5 minutes à 1 heure respectivement [189], [192].

Murugan et *al.* ont démontré que le traitement au plasma oxygène est plus efficace que le piranha ou un mélange méthanol/acide chlorhydrique, MeOH : HCL (1 :1), pour l'activation d'une surface de silicium. Tous les protocoles ont entraîné une diminution de l'angle de contact par rapport à la surface initiale (30 °), indiquant une surface plus hydrophile après traitement. Le piranha et le mélange de MeOH :HCL ont réduit l'AC à environ 20 ° tandis que le plasma d'oxygène a rendu la surface superhydrophile, sans mesure possible [191]. D'autres études ont montré que l'utilisation de l'UV-ozone nettoie efficacement les contaminants organiques et rend la surface fortement hydrophile sans augmenter la rugosité de la surface, contrairement au plasma O_2, considéré comme une méthode plus rapide mais plus agressive [193], [194].

ii. Influence de la quantité d'eau

La quantité d'eau présente dans le solvant lors de la réaction de silanisation a une influence sur l'étape d'hydrolyse mais également sur les réactions de condensation [195]. En absence d'eau, la première étape de la silanisation, l'hydrolyse, n'a pas lieu. Sa présence est donc nécessaire. La qualité de la monocouche de silanes est directement influencée par ce paramètre. Si la quantité d'eau n'est pas suffisante, la formation de silanol peut être incomplète. Au contraire, une trop forte teneur en eau apportera un excès d'homocondensation, et donc de polymérisation, au détriment de l'hétérocondensation nécessaire au greffage des silanes sur la surface. Il est donc préférable de travailler avec des solvants anhydres pour mieux contrôler la présence d'eau dans la réaction, ce qui favorisera l'hétérocondensation et évitera une polymérisation non contrôlée des silanes [189]. Dans la littérature, la silanisation d'APTES est très souvent réalisée dans des solvants anhydres tels que le toluène, l'acétone et plus rarement l'éthanol. L'eau étant présente sur la surface du

substrat ou sous forme de résidus dans la solvant, l'hydrolyse APTES est initiée par ces traces d'humidité [108].

iii. Influence du pH

Le pH de la solution a également une influence sur les réactions d'hydrolyse et de condensation. En ce qui concerne l'hydrolyse, la Figure V.5.A montre que cette réaction est catalysée en milieu acide ou basique [196]. En milieu acide, la protonation des groupes alkoxysilane (Si-OR) augmente le caractère électrophile du silicium, ce qui facilite l'attaque nucléophile des molécules d'eau et favorise l'hydrolyse menant à la formation de silanols (Si-OH). En milieu basique, les silanols formés sont déprotonés, ce qui augmente la charge négative sur l'oxygène et accroît la sensibilité de la surface à l'attaque nucléophile par les molécules d'eau [186], [187]. Ainsi en milieu neutre, la réaction d'hydrolyse sera plus lente mais tout de même présente.

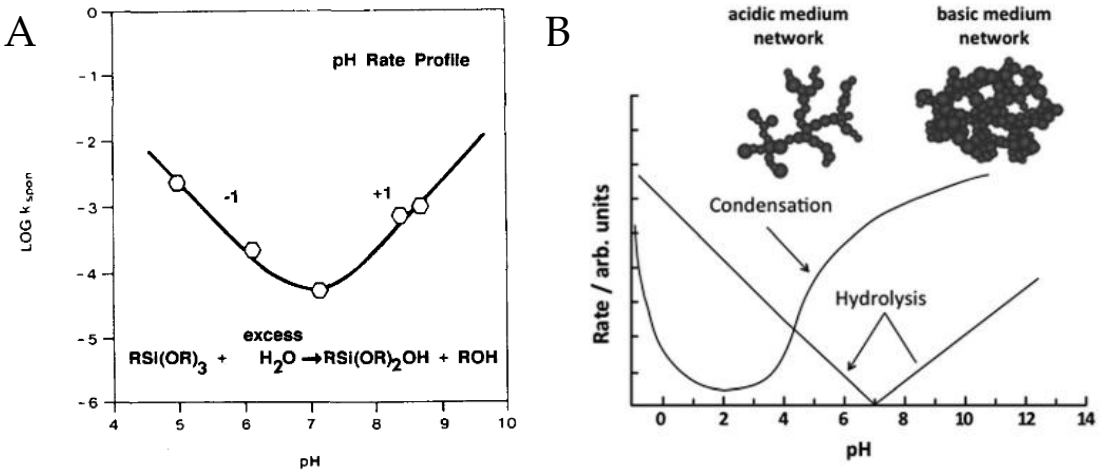


Figure V.5 : A- Constante de vitesse de la réaction en fonction du pH pour l'hydrolyse du 7-glycidoxypropyltrialkoxysilane en solution aqueuse [196], B- Taux des réactions d'hydrolyse et de condensation des tétra-alcoxysilanes en fonction du pH [197].

Les phénomènes de condensation sont également très influencés par le pH du milieu réactionnel. D'après la Figure V.5.B, la condensation est faible pour un pH entre 1 et 3 puis augmente dans un milieu plus basique [196], [198]. Les groupes silanols de surface sont protonés en milieu acide (pH 2 à 5), ce qui entraîne l'hydrolyse des groupes alkoxysilanes sous catalyse protonique favorisant l'hétérocondensation avec les silanols de la surface et permettant de former des couches fines et ordonnées. En milieu basique (pH 8 à 11), les ions OH^- catalysent l'homocondensation entre silanols, formant rapidement une couche pouvant être plus dense et irrégulière.

Nagare *et al.* ont également démontré l'influence du pH sur la silanisation de triméthoxysilane (AEAPTES) en solvant mixte éthanol/acide acétique pour des pH de 3, 4 et 5, [199]. En marquant les fonctions amine avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), les auteurs ont montré une meilleure densité de greffage du silane à pH 5 (Figure V.6). Ce résultat est en accord avec les études présentées plus haut.

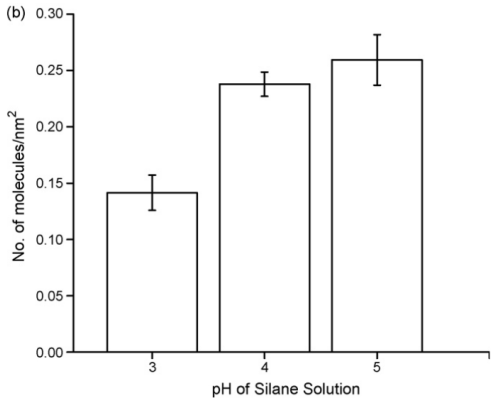


Figure V.6 : Densité de sites aminés pour des pH allant de 3 à 5 et dosée à l'aide de molécules d'FITC présentée par Nagare et al. [199]

En milieu acide, la nature de l'acide (acide acétique) peut également exercer une influence importante sur la réaction [200]. Pendant la réaction d'hydrolyse, des molécules d'alcool se forment et peuvent réagir avec l'acide acétique, ce qui forme un ester. La formation de cet ester déplace l'équilibre de la réaction et accélère de façon significative la cinétique d'hydrolyse du silane à pH constant. En milieu basique, en revanche, la nature de la base influe peu ou pas sur les cinétiques de réactions.

iv. Influence du solvant

Les études présentées précédemment ont montré que le contrôle de la quantité d'eau lors de la réaction de silanisation est primordial. Sachant que l'eau peut être présente à la surface du substrat ou dans le solvant, la majeure partie du temps les solvants utilisés sont des solvants organiques anhydres.

En effet, l'utilisation d'un solvant anhydre a un impact sur l'épaisseur de la couche de silanes greffée. J. Kim *et al.* ont travaillé avec le silane APTES soit dans du toluène anhydre, soit dans une solution aqueuse PBS (phosphate-buffered saline) [201]. Dans le toluène anhydre, les groupes éthoxy de l'APTES ne s'hydrolysent pas complètement étant donné la faible quantité d'eau présente à la surface. Ils se condensent avec les groupes silanols de la surface du substrat et avec ceux des autres silanes d'APTES pour former un film long et épais à la surface du substrat. La condensation étant lente par manque d'eau, plus le temps de réaction augmente, plus le film est épais et contient des agrégats d'APTES physisorbés qui peuvent en partie être éliminés par lavage sous ultrasons.

Dans une solution aqueuse PBS, la plupart des groupes éthoxy de l'APTES sont facilement hydrolysés en silanols. De plus, le PBS ayant un pH de 7,4, le groupe amine de l'APTES est partiellement protoné dans ce cas-là, ce qui crée une interaction électrostatique avec la surface de l'oxyde de silicium qui, elle, est chargée négativement [202]. Les groupes silanols chargés négativement vont eux s'éloigner de la surface (Figure V.7).

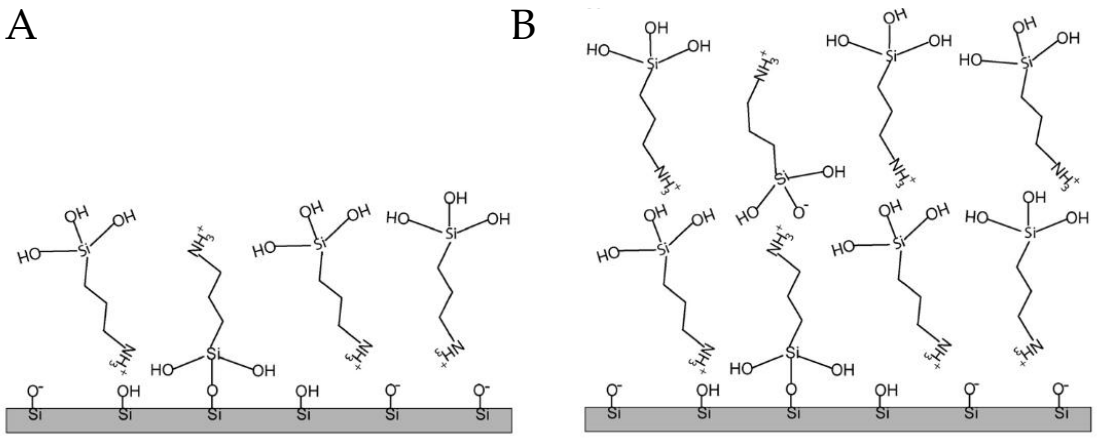


Figure V.7 : Représentation schématique de l'APTES adsorbé sur un substrat de silicium dans du PBS présentée par Kim et al. [201].

L'étude nous montre que le choix du solvant influence fortement la cinétique et la nature de la réaction de silanisation avec l'APTES. Dans le toluène anhydre, l'hydrolyse des groupes éthoxy favorise une condensation lente et équilibrée entre hétérocondensation et homocondensation, ce qui entraîne la formation d'une couche épaisse contenant aussi des silanes physiosorbés. En revanche, dans une solution aqueuse de PBS, l'hydrolyse complète des éthoxysilanols et la protonation partielle des amines entraînent des interactions électrostatiques avec la surface, qui sont plus faibles et réversibles, conduisant à des couches fines et moins stables.

Un autre facteur important est la polarité du solvant qui affecte la solubilité des silanes dans le mélange réactionnel. Plusieurs études ont démontré cette influence, notamment A. M. Abu El-Soad *et al.* ont analysé l'effet de la polarité du solvant sur la réaction de silanisation de (3-glycidyloxypropyl) triméthoxysilane (GOPTMS) sur une surface de nano-argile halloysite (HNT). Les solvants étudiés sont : protiques polaires (éthanol), aprotiques polaires (tétrahydrofurane (THF) et acétonitrile) et non polaires (hexane, 1,4-dioxane et toluène). Les réactions de silanisation ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), analyse élémentaire, microscopie électronique à balayage (MEB), thermogravimétrie (TGA), ou encore par analyse par diffraction des rayons X (XRD) (Figure V.8). [203]

Les solvants protiques polaires à grande constante diélectrique, tels que l'éthanol, sont ceux développant de nombreuses interactions de Van der Waals et liaisons hydrogènes avec les molécules de silanes, empêchant ces dernières de se condenser avec les groupes hydroxyles sur les surfaces HNT. Au contraire, les solvants apolaires à faible constante diélectrique tels que le n-hexane ne forment pas de liaison H avec les molécules de silanes, ce qui favorise leur condensation avec les groupes hydroxyle de la surface des HNT.

Sample	Content (%)			Solvent	Degree of functionalization (%)
	C	H	N		
SZ1	8.98	2.73	0.00	Toluene	45.6
SZ2	8.56	2.66	0.00	THF	43.5
SZ3	4.56	2.19	0.00	Ethanol	23.2
SZ4	18.31	3.9	0.00	n-Hexane	93.3
SZ5	4.12	2.15	0.00	1, 4 dioxane	21.0
SZ6	4.12	2.12	0.00	Acetonitrile	21.0

Figure V.8 : Analyse élémentaire d'échantillons de HNT greffés chimiquement dans différents types de solvants à l'aide de l'agent organosilane trifonctionnel [GOPTMS], par A. M. Abu El-Soad et al. [203].

v. Influence de la quantité de silanes et du temps de réaction

Aissaoui et *al.* ont étudié l'influence de la concentration d'APTES (préparé dans du toluène) et du temps de réaction sur la formation de couches de silane sur des surfaces de silicium oxydé. Ils ont démontré leurs résultats par spectroscopie IR à réflectance totale atténuée à angle rasant (GA-ART, Grazing Angle Attenued Total Reflection) en utilisant le rapport d'intensité entre les bandes Si-O-Si du silane et de l'oxyde de silicium. Les résultats, présentés sur la Figure V.9, montrent que l'augmentation de la concentration d'APTES entraine une augmentation de la quantité de silane déposée sur la surface. De plus, on observe que le temps de réaction augmente également la quantité de silane déposé, jusqu'à atteindre un plateau après 12 h d'incubation. Les auteurs concluent qu'une concentration de 50 mM d'APTES et environ 12 h d'incubation permettent d'obtenir une surface correctement silanisée [204].

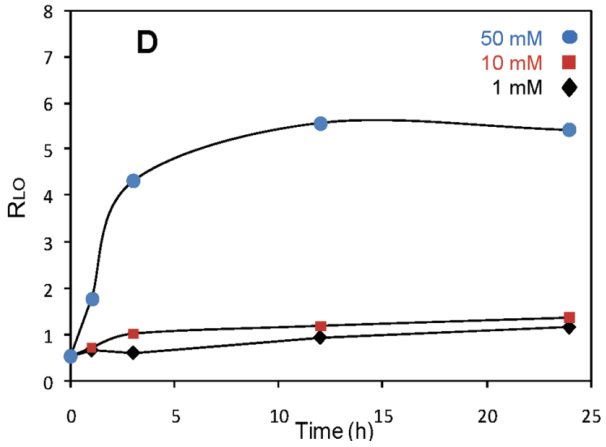


Figure V.9 : Graphique représentant l'évolution du rapport R_{LO} en fonction du temps pour trois concentrations d'APTES, correspondant au rapport I_{1140}/ I_{1230} des intensités à 1140 cm^{-1} et 1230 cm^{-1} du spectre GA-ATR (grazing angle attenuated total reflection) de Aissaoui et al. [204].

Arnfinnsdottir *et al.* ont confirmé ces résultats en étudiant des solutions d'éthanol à 96 % et d'acide acétique à 1 mM contenant 1 %, 2 % et 4 % d'APTES, soit respectivement 43 mM, 85 mM et 170 mM, et pour des durées respectives de 10, 20 et 60 minutes. Cependant, après analyse des signaux XPS et de la topographie par AFM (Atomic Force Microscopy), ils ont

également observé que lorsque la concentration et le temps de réaction sont trop élevés (4 % et 60 min), la surface devient plus rugueuse et présente des agrégats, ce qui suppose une polymérisation et une organisation moins homogène de la couche de silane [205]. Cette rugosité est également observée dans les travaux de Howarter et *al.* qui précisent que le temps de réaction est le paramètre influençant le plus l'épaisseur et la rugosité des couches de silane [206].

vi. Influence de la température

Certains protocoles de silanisation réalisent l'incubation à température ambiante [207], [208], et d'autres à différentes températures telles que 90°C [209], 80°C [210], 60°C [211]. La température a un effet direct sur la cinétique de réaction comme le montre l'étude d'Howarter et *al.* [206]. À 75 °C, la mobilité de l'APTES dans le toluène est élevée, ce qui favorise une déposition plus rapide et plus épaisse de la couche de silane sur la surface oxydée. Cependant, cela entraîne également une hydrolyse partielle des groupes éthoxy et augmente l'homocondensation des silanes, rendant les couches moins stables [212]. Pour autant, certaines études observent de meilleurs résultats pour l'absorption de protéines après silanisation à haute température (90 °C), ce qui souligne la complexité de l'influence de ce paramètre [213].

Pour éviter ces inconvénients, un traitement thermique, post-silanisation, est couramment utilisé. Les conditions rapportées dans la littérature varient généralement entre 60 °C et 120 °C pendant des durées allant de 10 min à 2 h [207], [211], [214]. Certaines études suggèrent que ce traitement améliore la densité et la stabilité chimique de la couche de silane, notamment en facilitant l'élimination de l'eau résiduelle et en agissant comme un catalyseur pour la formation de liaisons silanols plus denses [215], [216].

V.1.3 Développement d'une méthode de silanisation de surface SIO_2 éco-responsable

i. Chimie verte et solvants

Pour développer des procédés chimiques plus durables, le choix du solvant est l'un des paramètres les plus importants à prendre en compte, notamment pour les procédés de silanisation de surface par voie liquide. Dans ce contexte, la chimie verte vise à privilégier des solvants ayant une faible toxicité, un faible impact environnemental et une origine biosourcée. L'éthanol fait partie des solvants les plus couramment employés dans les approches de chimie verte. Contrairement aux solvants aromatiques tels que le toluène, qui sont issus de ressources pétrochimiques, l'éthanol peut être produit à partir de biomasse par fermentation, ce qui réduit son empreinte carbone. Il est également peu toxique et a une bonne biodégradabilité contrairement au toluène et au DMSO (Diméthylsulfoxyde) considérés comme plus néfastes d'un point de vue environnemental et sanitaire [217], [218].

ii. Étude préliminaire avec l'APTES

De nombreux paramètres influencent la qualité d'une surface silanisée. Certains d'entre eux ont été étudiés pour mettre en place un protocole de silanisation optimisé et éco-

responsable utilisant l'éthanol (EtOH) comme solvant. Au début de la thèse, puis grâce aux travaux menés par Yvana Kouatche lors de son stage de Master 2 sur la silanisation de l'APTES, un protocole a été mis en place. Plusieurs paramètres expérimentaux ont été étudiés et optimisés, notamment :

- L'activation de la surface, en comparant plusieurs méthodes d'activation telles que le piranha, l'UV-ozone et le plasma O_2.

- La concentration de silane (0,5 mM, 1 mM, 5 mM et 10 mM).

- La composition du solvant : éthanol anhydre, éthanol anhydre contenant 5 % d'eau déionisée et l'éthanol anhydre contenant 0,14 % d'acide acétique (pH = 4,5).

- Les étapes de lavage : absence de lavages, lavage à l'eau déionisée avec 0,1 % ou 6 % d'acide acétique.

Les méthodes de caractérisation utilisées pour évaluer ces paramètres (angle de contact, ellipsométrie spectroscopique, spectroscopie photoélectronique à rayons X, dosage colorimétrique des amines) ont permis de définir le protocole final de silanisation, présenté dans le chapitre II. Ce protocole a ensuite été appliqué avec des mélanges de silane-PEG-OH et silane-PEG-DBCO pour la réalisation d'une réaction de chimie click. La caractérisation des surfaces silanisées avec ces silanes est présentée dans la section suivante.

V.1.4 Caractérisation de la silanisation en phase liquide

Afin de valider la fonctionnalisation de la surface de SiO_2 par les silane-PEG-DBCO et silane-PEG-OH, deux méthodes de caractérisation ont été utilisées : la mesure de l'angle de contact et la spectroscopie XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy). La mesure de l'angle de contact a permis d'évaluer rapidement et de façon qualitative les modifications de surface entrainant une modification de la mouillabilité de la surface. La spectroscopie XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) a été utilisée pour analyser la composition chimique de la surface et identifier les fonctions chimiques présentes.

i. Paramètres étudiés

Le protocole de silanisation a été réalisé à partir de solutions de silanes mixtes pour étudier l'influence de la gêne stérique sur l'immobilisation des anticorps à la surface du biocapteur. La présence excessive du groupement DBCO entraîne un encombrement stérique important, ce qui limite l'accès des sites réactifs présents sur la surface. C'est pourquoi un silane porteur d'une chaîne PEG de 2 000 Da, terminé par un groupement hydroxyle (silane-PEG-OH), a été utilisé comme diluant. Des solutions contenant différents ratios de silane-PEG-DBCO/silane-PEG-OH (1 :1, 1 :2 et 1 :4) ont été utilisées pour réaliser la silanisation de plusieurs échantillons. L'influence de la longueur de la chaîne PEG a également été étudiée avec des chaînes PEG à 2000 Da et à 3400 Da pour le silane-PEG-DBCO. Les six conditions étudiées sont récapitulées sur la Figure V.10. Un témoin négatif a été mis en place, en

reproduisant les mêmes conditions que pour les substrats silanisés mais sans silane dans le solvant.

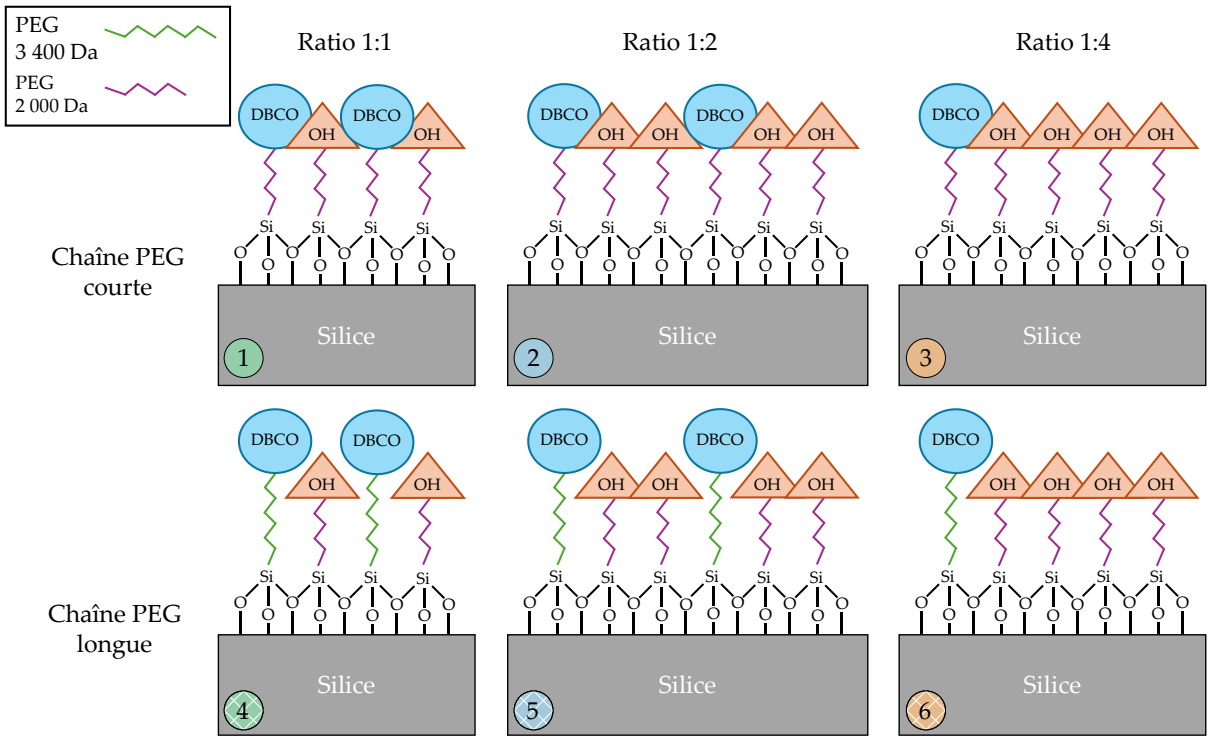


Figure V.10 : Conditions expérimentales étudiées avec le protocole de silanisation pour différents ratios silane-PEG-DBCO/silane-PEG-OH et pour deux longueurs de chaîne (masse molaire) PEG différentes, 2000 Da et 3400 Da, (1) ratio 1:1, chaîne PEG courte, (2) ratio 1:2, chaîne PEG courte, (3) ratio 1:4, chaîne PEG courte, (4) ratio 1:1, chaîne, PEG longue, (5) ratio 1:2, chaîne, PEG longue, (6) ratio 1:4, chaîne, PEG longue.

ii. Caractérisation par mesure de l'angle de contact

Le substrat de silicium vierge, avant tout traitement, présente un angle de contact moyen de 61,7 °. Après l'étape d'activation à l'UV-ozone, les angles de contact moyens des témoins négatifs diminuent significativement à 26,2 ° et 36,1 °. Ce résultat indique que l'étape d'activation à l'UV-ozone est efficace car l'angle de contact diminue avec l'augmentation des groupements silanols (Si-OH) hydrophiles sur la surface des substrats. Cependant, les substrats silanisés présentent des angles de contact moyens du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour les substrats témoins non silanisés, avec des valeurs comprises entre 29,2 ° et 34,8 °. Les mesures d'angles de contact ne permettent donc pas de conclure sur le succès de la réaction de silanisation.

iii. Caractérisation par XPS

Les orbitales C1s, O1s, N1s et Si2p des substrats témoins (non silanisés) et des substrats silanisés ont été analysées par spectroscopie XPS. Les spectres XPS haute résolution associés à chaque orbitale sont présentés sur la Figure V.11. Pour le témoin négatif, le spectre C1s met en évidence une faible contamination organique provenant de plusieurs contributions, avec une composante dominante à 284,8 eV qui est attribuée aux liaisons C-C/C-H. Par ailleurs, le pic à

532,8 eV dans la région O1s ainsi que les pics de la région Si2p entre 103 eV et 104 eV sont caractéristiques d'un substrat contenant de l'oxyde de silicium, comme attendu. Enfin, l'absence de signal dans la région N1s confirme que la surface du témoin négatif n'est pas contaminée par des espèces azotées. Ces résultats sont donc en accord avec la surface de silicium oxydée en surface non fonctionnalisée par les silanes mais recouverte d'une faible contamination organique.

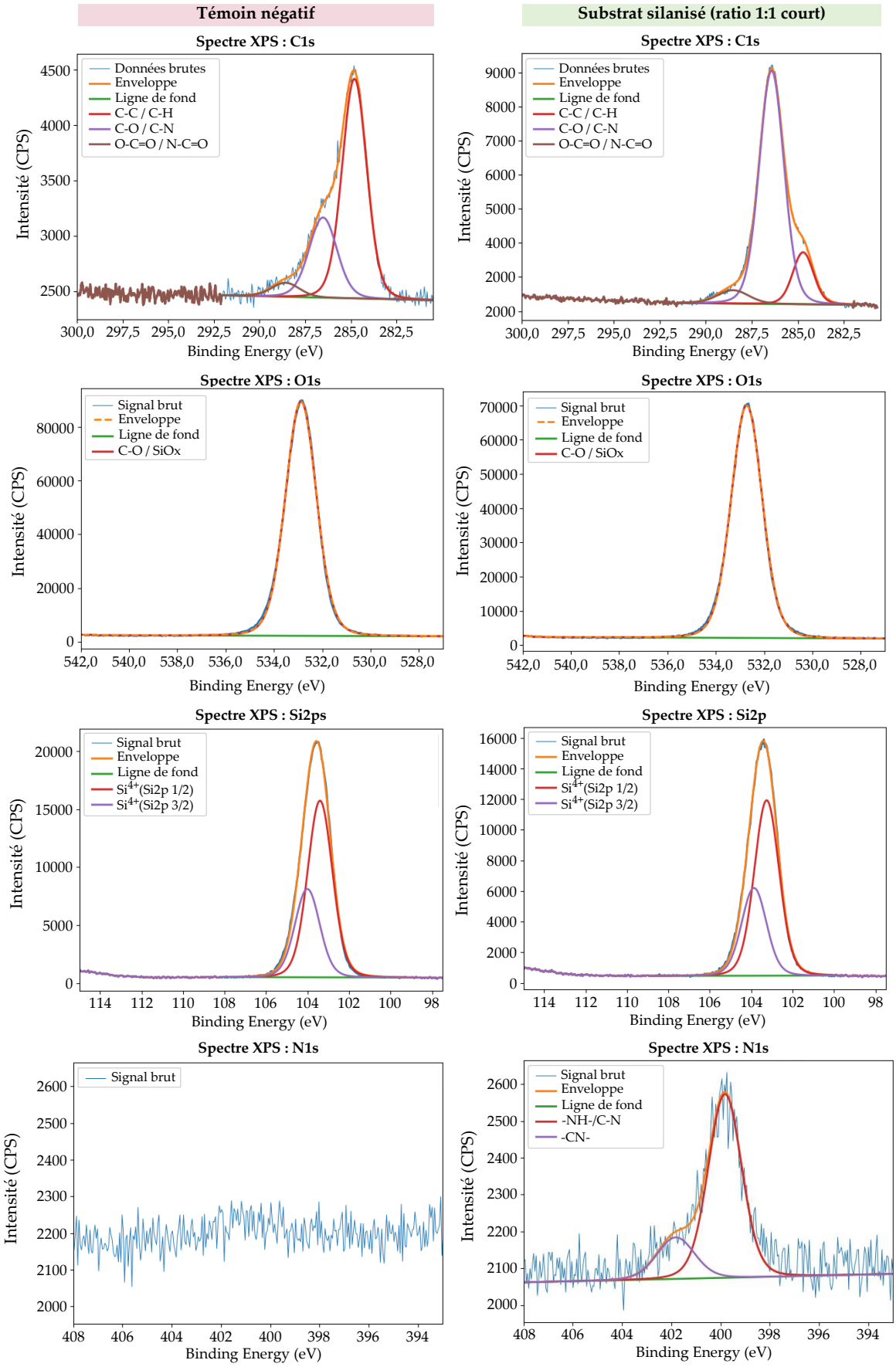
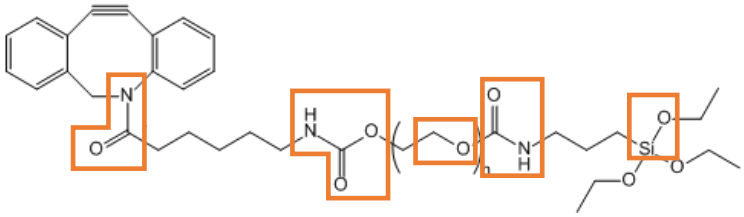


Figure V.11: Spectres XPS haute résolution des régions C1s, O1s, Si2p et N1s pour un substrat témoin et un substrat silanisé (ratio 1 :1 court).

Pour le substrat silanisé, le spectre C1s est très différent de celui du témoin négatif, avec une forte augmentation de la contribution C-O/C-N attribuable à la présence des chaînes PEG sur la surface (Figure V.12). De plus, deux contributions (-NH/-CN- et -CN-) sont détectées dans la région N1s, confirmant la présence des molécules de silane-PEG-DBCO et silane-PEG-OH (Figure V.12). Enfin, les signaux de la région Si2p ont diminué par rapport au témoin négatif, suggérant le recouvrement de la surface d'oxyde de silicium probablement par la couche de silane. Ces résultats confirment le succès de la fonctionnalisation des silanes sur la surface.

1 - Silane-PEG-DBCO (triéthoxysilane-polyéthylène glycol-dibenzocyclooctyne)



2 - Silane-PEG-OH (triéthoxysilane-polyéthylène glycol-hydroxy)

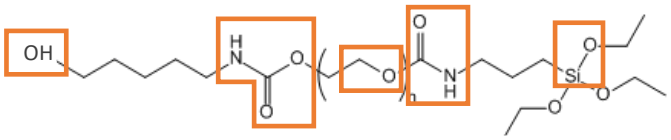


Figure V.12 : Fonctions chimiques présentes sur les silane-PEG-DBCO et silane-PEG-OH.

Si l'on s'intéresse aux compositions atomiques compilées dans le Tableau V-1, on observe qu'après silanisation, les pourcentages de la région C1s augmentent nettement par rapport au substrat témoin, avec un maximum pour les ratios 1 :1 (court : 18,0 %, long : 19,0 %). Ce résultat est confirmé avec l'analyse du rapport [C]/[Si] de chaque condition (Tableau V-2). Celui-ci étant un indicateur du taux de recouvrement de la surface : plus il est élevé, plus la surface est recouverte d'une couche de silane. En effet, pour les substrats témoins, les rapports sont de 0,2 et 0,25, tandis qu'ils sont 2 à 4 fois plus élevés après silanisation, avec un maximum pour le ratio 1 :1, aussi bien pour les chaînes courtes que pour les chaînes longues (0,78 et 0,79 respectivement). Cela indique une meilleure fonctionnalisation de la surface pour le ratio 1 :1, quelle que soit la longueur de la chaîne PEG.

À l'inverse, le ratio 1 : 4 avec des chaînes longues présente le plus faible recouvrement, avec un pourcentage atomique de 9,8 % pour la région C1s et un rapport [C]/[Si] de 0,37. Ces résultats peuvent signifier que les chaînes PEG plus longues occupent plus d'espace, ce qui limiterait la densité de greffage.

Dans un second temps, l'analyse des pourcentages atomiques et des rapports impliquant l'azote permet d'apporter des informations complémentaires sur la composition de la surface fonctionnalisée. Les pourcentages atomiques de la région N1s et les rapports [N]/[Si] sont au moins deux fois plus élevés pour les chaînes PEG courtes que pour les chaînes PEG longues, ce qui indique une présence plus faible d'azote pour les chaînes longues et peut supposer une densité de greffage plus limitée. Les rapports [N]/[C] sont également plus faibles pour les

longues chaînes PEG, traduisant une proportion plus importante de carbone que d'azote sur la surface. Ce résultat peut s'expliquer par rapport à la longueur de la chaîne PEG longue, qui contient 64 atomes de carbone supplémentaires par rapport aux chaînes PEG courtes. De plus, le ratio PEG-DBCO / PEG-OH ne semble pas avoir d'influence, probablement car la variation attendue est trop faible pour être significativement détectable.

Par la suite, nous avons calculé pour chaque ratio PEG-DBCO/PEG-OH le nombre théorique d'atomes d'azote et de carbone présents. À partir de ces résultats, les rapports théoriques [N]/[C] associés ont été analysés (Tableau V-3). Les mêmes tendances que celles observées pour les compositions atomiques sont retrouvées, ce qui confirme la cohérence des résultats d'XPS. Les rapports [N]/[C] théoriques pour les chaînes courtes sont environ 2 fois moins élevés que les données obtenues par l'analyse XPS, contrairement aux résultats des chaînes longues qui sont plus proches. Ces résultats semblent suggérer que les chaînes courtes formeraient deux couches sur la surface alors que les chaînes longues n'en formeraient qu'une seule.

	C1s				**N1s**			**O1s**	**Si2p 3/2**	**Si2p 1/2**	
	C-C/ C-H	C- O / C-N	O-C=O/ N-C=O	Total C1s	-NH-/-CN-	-CN-	Total N1s	SiOx/ C-O	Si4+	Si4+	Total Si2p
Témoin 1	3,7	1,5	0,3	**5,5**	-	-	-	66,8	18,5	9,2	**27,7**
Ratio 1:1 court	2,7	14,3	1,0	**18,0**	0,7	0,2	**0,8**	57,9	15,5	7,7	**23,2**
Ratio 1:2 court	2,9	10,0	0,6	**13,5**	0,4	0,2	**0,6**	60,6	16,9	8,5	**25,4**
Ratio 1:4 court	2,8	13,1	0,8	**16,8**	0,5	0,2	**0,7**	58,6	16,0	8,0	**23,9**
Témoin 2	3,9	2,3	0,5	**6,7**	-	-	-	66,2	18,1	9,0	**27,1**
Ratio 1:1 long	8,0	10,1	0,9	**19,0**	0,2	0,1	**0,3**	56,7	16,0	8,0	**24,0**
Ratio 1:2 long	2,1	9,4	0,8	**12,3**	0,2	0,1	**0,3**	61,7	17,1	8,5	**25,6**
Ratio 1:4 long	2,1	7,1	0,6	**9,8**	0,2	0,1	**0,3**	63,7	17,5	8,8	**26,3**

Tableau V-1 : Composition atomique (%) de chaque région C1s, N1s, O1s, Si2p, pour les deux témoins non silanisés et les substrats silanisés à partir de différents ratios et de différentes longueurs de chaîne du silane-PEG-DBCO.

	[C]/[Si]	[N]/[Si]	[N]/[C]
Témoin 1	0,2	0	0
Ratio 1:1 court	0,78	0,035	0,046
Ratio 1:2 court	0,53	0,023	0,043
Ratio 1:4 court	0,7	0,029	0,041
Témoin 2	0,25	0	0
Ratio 1:1 long	0,79	0,011	0,014
Ratio 1:2 long	0,48	0,013	0,028
Ratio 1:4 long	0,37	0,010	0,028

Tableau V-2 : Ratios atomiques caractéristiques [C]/[Si], [N]/[Si] et [N]/ [C] pour chaque condition de silanisation.

	[C]	[N]	[N]/[C]
Ratio 1:1 court	224	5,000	0,022
Ratio 1:2 court	328	7,000	0,021
Ratio 1:4 court	536	11,000	0,021
Ratio 1:1 long	288	5,000	0,017
Ratio 1:2 long	392	7,000	0,018
Ratio 1:4 long	600	11,000	0,018

Tableau V-3 : Estimation théorique du nombre d'atomes de carbone et d'azote pour chaque ratio et rapport [N]/[C] correspondant.

L'ensemble de ces résultats de caractérisation confirme la présence des silanes PEG-DBCO et PEG-OH sur la surface des substrats fonctionnalisés et semble montrer que le ratio 1 :1 offre un meilleur recouvrement de la couche de silanes sur la surface du silicium

contrairement au ratio 1 :4 long. La longueur de la chaîne PEG semble également influencer l'efficacité de la silanisation, les chaînes courtes conduisant à la formation de 2 couches de silane sur la surface. Les chaînes longues, quant à elles, permettraient d'obtenir 1 seule couche de silane. Ceci peut être dû à des phénomènes de repliement des chaînes PEG entrainant une gêne stérique lors de la silanisation. Enfin, bien que le ratio 1 :1 semble conduire à une meilleure silanisation de la surface, il est nécessaire de valider l'effet des ratios silane-PEG-DBCO/silane-PEG-OH sur l'efficacité de l'activité de reconnaissance des anticorps immobilisés par chimie click. Le principe de la chimie click et sa caractérisation sont présentés dans la partie suivante.

V.2 Immobilisation orientée des anticorps par chimie click

V.2.1 Principe de la chimie click

Développée à partir de 2001, la chimie click a eu un fort impact scientifique et économique. Cela a permis à ces concepteurs K. B. Sharpless et P. Meldal d'obtenir le prix Nobel de chimie 2022 avec C. Bertozzi [111]. La chimie click s'inspire des réactions chimiques de la nature qui préfèrent former des liaisons carbone-hétéroatomes plutôt que des liaisons carbone-carbone. La chimie click correspond donc à l'utilisation de briques moléculaires qui s'assemblent en un clic comme une ceinture de sécurité. Il existe de nombreuses réactions de chimie click, toutes définies par des critères stricts : la réaction doit être modulaire, avec un rendement élevé, ne générant que des sous-produits inoffensifs, elle s'effectue avec des matières premières et des réactifs simples et facilement disponibles et n'utilise aucun solvant ou des solvants verts. Le produit final doit être stable et robuste. On peut prendre en exemple la réaction de Huisgen qui consiste en une cycloaddition dipolaire-1,3 impliquant un dipôle-1,3 comme un azoture, qui peut réagir avec un alcène en travaillant à une température élevée pour former un triazole. À la suite de leur découverte, K. B. Sharpless et P. Meldal ont par la suite mis en lumière les effets catalytiques du cuivre sur les réactions de cycloaddition entre un azoture et un alcyne et ont appelé cette réaction Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC). Cette réaction a très vite eu un grand succès auprès de la communauté scientifique, notamment ceux travaillant sur les systèmes biologiques, car elle ne nécessite plus l'utilisation d'une température élevée. Malheureusement, son application dans la biologie fut vite limitée à cause de la présence du cuivre qui est toxique pour l'organisme. C'est en 2004 que Carolyn R. Bertozzi et son équipe ont utilisé les particularités de la cycloaddition [3 + 2] des cycloalcynes pour remplacer la chimie CuAAC dans les systèmes biologiques [219]. En effet, leur chimie click utilise le principe de contrainte cyclique de la cycloaddition entre un azoture et un dérivé de cyclooctyne, réaction découverte en 1961 par Wittig et Krebs, qui forme une liaison triazole [220]. Cela s'explique par une déformation importante de l'angle de liaison, ce qui fournit une accélération de la vitesse de réaction sans utiliser de catalyseur [219]. Cette réaction est donc compatible avec les systèmes biologiques et peut être utilisée pour des modifications chimiques sélectives de cellules vivantes. Plus connue sous le nom de « strain-promoted azide–alkyne cycloaddition » ou SPAAC, cette chimie est bio-orthogonale. Cela signifie que c'est une chimie qui se produit dans un système biologique sans perturber les réactions propres au milieu. Les réactifs introduits vont réagir uniquement entre eux sans nuire à l'organisme vivant. C'est donc cette technique que nous

avons choisie pour greffer des anticorps sur des surfaces silanisées. La fonction cyclooctyne, présente sur le silane pour la réaction SPAAC, est le dibenzocyclooctyne (DBCO), (Figure V.13).

Plus précisément, le motif DBCO est lié à une chaîne polyéthylène glycol greffée à un triéthoxysilane (Silane-PEG-DBCO). L'anticorps à immobiliser est lui-même modifié enzymatiquement sur la région carbohydrate du Fc (fragment cristallisable) avec un azoture ($-N_3$). Après fonctionnalisation de la surface SiO_2 avec le silane-PEG-DBCO, la réaction de chimie click avec l'anticorps modifié permet d'orienter son immobilisation sur la surface du capteur via la formation d'un triazole (Figure V.13).

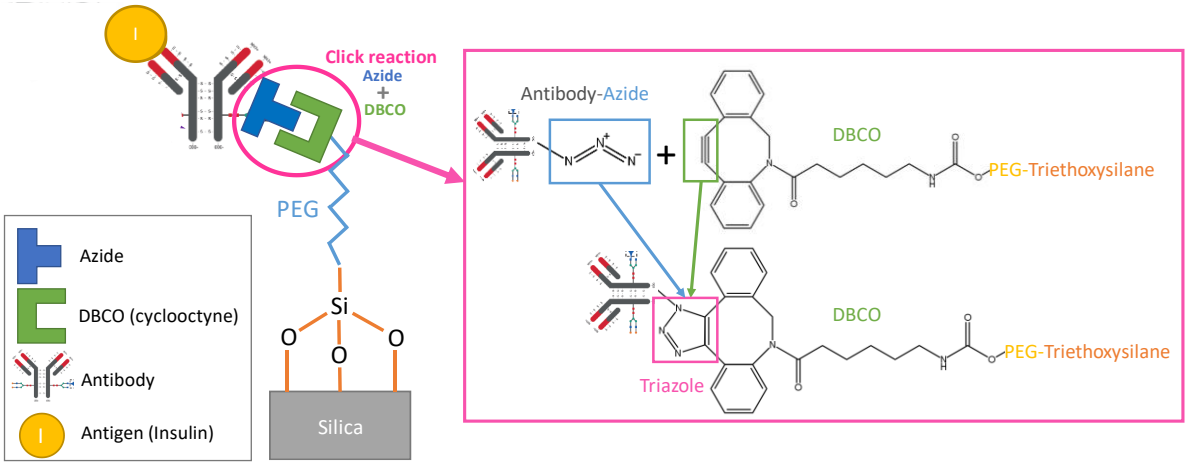


Figure V.13 : Après avoir silanisé la surface du biocapteur avec un silane-PEG-DBCO et modifié les anticorps avec un azoture, la réaction de chimie click a lieu en formant un triazole à partir du DBCO et de l'azoture, permettant l'immobilisation orientée des anticorps sur la surface du biocapteur.

V.2.2 Caractérisation de la réaction de chimie click

Pour évaluer l'efficacité de la réaction de chimie click sur les substrats silanisés, nous avons immobilisé des fonctions azoture marquées à l'AlexaFluor 647 (AF-N_3). L'objectif de ces caractérisations est de valider la réaction de chimie click pour les différentes conditions de silanisation.

La caractérisation a été réalisée sur des surfaces silanisées avec un mélange de silane-PEG(3400Da)-DBCO (long)/silane-PEG-OH pour les ratios 1 :2 et 1 :4. Le protocole détaillé est présenté en Annexe O. Cette caractérisation a été réalisée par Pauline Zimmer (doctorante à l'INL) pour deux concentrations différentes d'AF-N_3 (2,94 µM et 5,88 µM). Seul le bruit de fond local a été soustrait aux données brutes. La méthode de normalisation du chapitre II n'a pas pu être utilisée car aucun contrôle interne n'est présent.

Tout d'abord, les intensités de fluorescence mesurées sur les surfaces silanisées sont significativement supérieures à celles des témoins négatifs non silanisés, avec un facteur supérieur à 3 pour toutes les conditions (Figure V.14). Cela confirme qu'une immobilisation spécifique d'AF-N_3 liée à la chimie click a bien lieu sur les surfaces silanisées.

Cependant, les témoins négatifs présentent des intensités de fluorescence différentes selon la concentration d'AF-N_3 déposée. Pour interpréter correctement les résultats, il est donc

nécessaire de s'affranchir de ces signaux non spécifiques. Le signal de fluorescence spécifique à la réaction de chimie click est donc défini comme le rapport entre l'intensité de fluorescence du signal spécifique mesurée sur le substrat silanisé et celle du contrôle négatif associé, pour une même concentration d'AF-N_3.

Les rapports obtenus (Tableau V-4) montrent que, pour les deux ratios étudiés, la condition à 2,94 µM conduit à un signal spécifique plus élevé qu'à 5,88 µM (respectivement 4,50 vs 2,80 pour le ratio 1 :2, et 14,06 vs 5,78 pour le ratio 1 :4). Cette diminution du signal à plus forte concentration suggère un phénomène de saturation des sites réactifs et/ou un effet de quenching (diminution) de fluorescence.

Par ailleurs, pour une concentration donnée, le ratio 1 :4 présente systématiquement un signal spécifique supérieur au ratio 1 :2. Bien qu'il n'y ait pas de contrôle interne, on peut donc supposer que plus de liaisons triazoles se sont formées, par chimie click, à la surface des substrats silanisés pour un ratio 1 : 4 et que cette silanisation pourrait être plus efficace.

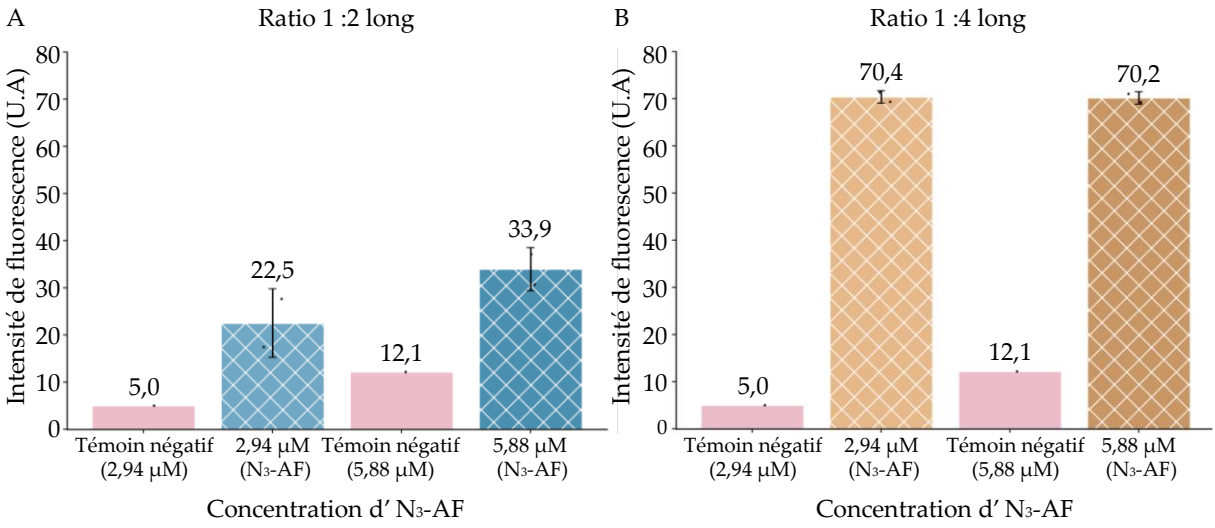


Figure V.14 : Graphique représentant l'intensité de fluorescence du complexe de reconnaissance azoture-AlexaFluor 647 (N_3-AF) par le substrat témoin et les substrats silanisés avec des ratios 1 :2 et 1 :4, (A) pour une concentration de 5,88 µM de N_3-AF et (B) pour une concentration de 2,94 µM de N_3-AF.

Ratio 1:2 long		Ratio 1:4 long	
2,94 µM	5,28µM	2,94 µM	5,28µM
4,5	2,8	14,1	5,8

Tableau V-4 : Résultats du rapport entre l'intensité de fluorescence spécifique et celle du contrôle négatif associé, pour une même concentration d'AF-N3.

V.2.3 Caractérisation de la réactivité biologique

La caractérisation de la réactivité biologique des anticorps immobilisés par chimie click sur la surface du capteur permet d'évaluer l'efficacité de cette immobilisation pour capturer spécifiquement les cibles d'intérêt. Pour ces tests, des anticorps de lapin modifiés avec un groupement azoture ont été immobilisés par chimie click et la reconnaissance d'anticorps anti-lapin-AF488 (cible) a été évaluée. Deux protocoles de reconnaissance ont été testés : reconnaissance dans des conditions en statique, et reconnaissance dans des conditions en flux (50 µL/min) avec la plateforme optofluidique.

i. Caractérisation en statique

Les 3 ratios silane-PEG-DBCO/silane-PEG-OH (1 :1, 1 :2 et 1 :4) pour des chaînes PEG courtes et longues ont été évalués pour la reconnaissance des anticorps cibles en fonction de leur concentration (10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL) à partir d'une même concentration d'anticorps de capture immobilisé (1 mg/mL). Le protocole d'immobilisation et la méthode d'analyse sont détaillés en Annexe P. La normalisation n'a pas pu être effectuée à cause de l'absence de contrôle interne, mais le bruit de fond local moyen a été soustrait pour chaque plot de fluorescence. Il n'y a pas de de témoin négatif pour ces résultats.

Les résultats présentés dans la Figure V.15 montrent que pour toutes les conditions testées, les valeurs de fluorescence dépendent de la concentration des anticorps cibles (anti-lapin AF488), confirmant la capture spécifique des anticorps cibles de façon dose-dépendante. Cet effet est très marqué pour les ratios 1 :1 et 1 :4 long et court, alors que pour le ratio 1 :2 long et court les résultats sont plus discutables. En effet, pour le ratio 1 :2 long, le signal de fluorescence est assez faible et varie très peu avec la concentration en anticorps cible (16.12, 12.43, 10.72 et 15.30 respectivement pour 10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL et 10 ng/mL). Alors que pour le ratio 1 :2 court, les deux concentrations 10 µg/mL et 1µg/mL ont des valeurs de fluorescence similaires élevées, respectivement 64,7 U.A et 62,08 U.A. Pour le ratio 1 :2 long, ces résultats s'expliquent par la présence de bulles lors de l'incubation et pour le ratio 1 :2, la lamelle pour la concentration de 10 µg/mL a glissé vers la zone à 1 µg/mL lors du dépôt de l'échantillon, ce qui a sûrement provoqué une contamination entre les deux zones de détection.

Le Tableau V-5 présente les valeurs du seuil de bruit de fond (Sbf) calculées à partir de 3 fois l'écart-type des bruits de fond locaux. Il apparait donc que pour toutes les surfaces et toutes les concentrations d'anticorps cibles testées, les valeurs de fluorescence obtenues (figure 15) sont toutes au moins 5 fois supérieures à leur Sbf respectif. Cela suggère que toutes les fonctionnalisations de surface testées permettent de détecter efficacement la reconnaissance spécifique de la cible, même à des concentrations faibles de l'ordre de 10 ng/mL, par les anticorps immobilisés.

Cependant, nous devons prendre en compte que pour ce protocole de réactivité biologique en condition statique, les 4 concentrations de la cible ont été étudiées sur un même substrat, ce qui peut provoquer des contaminations intra-test. De plus, l'utilisation d'une lame de verre pour déposer de manière homogène la cible à la surface du biocapteur est une approche qui peut amener des bulles d'air dans les tests et fausser les résultats. Idéalement, il

faudrait reproduire cette expérimentation avec un contrôle interne de fluorescence identique aux deux tests pour comparer les conditions entre elles, un témoin négatif interne comme un anticorps non spécifique à la cible, mais aussi tester cette immobilisation sur un substrat témoin non silanisé.

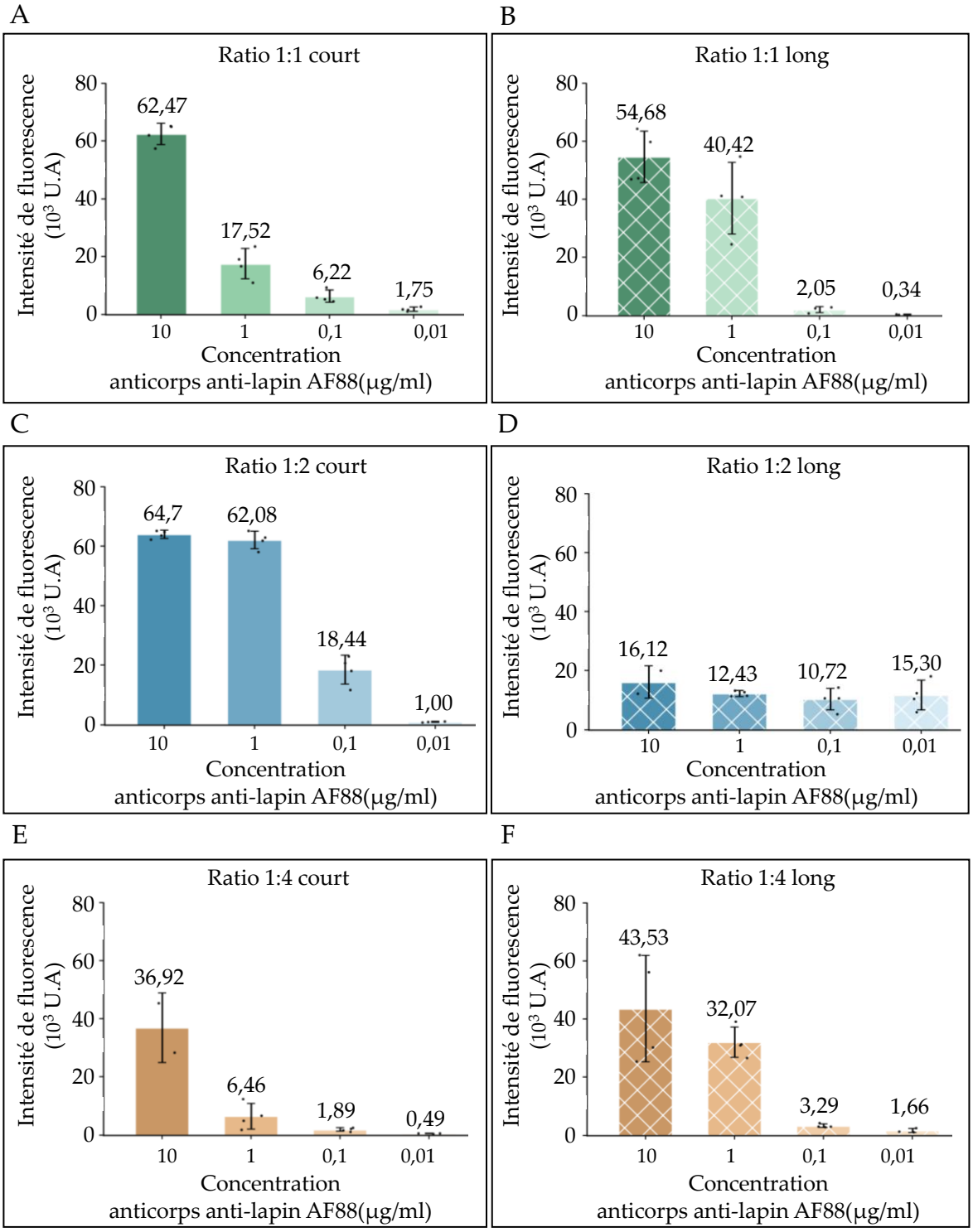


Figure V.15 : Graphiques représentant les niveaux de fluorescence en fonction des différentes concentrations de cible pour les 6 conditions après immobilisation d'anticorps anti-lapin AF488 (cible) dans des conditions statiques, A- ratio 1 :1 court, B-ratio 1 :1 long, C-ratio 1 :2 court, D-ratio 1 :2 long, E- ratio 1 :4 court et F ratio 1 :4 long.

Condition	Sbf ($3\sigma.10^3$)
1 : 1 court	0,038
1 : 2 court	0,068
1 : 4 court	0,060
1 : 1 long	0,064
1 : 2 long	0,027
1 : 4 long	0,031

Tableau V-5 : Valeurs des seuils de bruit de fond (SB) pour chaque condition.

ii. Caractérisation en flux avec la plateforme optofluidique

La caractérisation de la réactivité biologique des surfaces fonctionnalisées par chimie click avec l'anticorps de capture pour détecter les cibles d'intérêt a été effectuée dans des conditions en flux avec la plateforme optofluidique. Par manque de temps, le test a été effectué seulement pour les ratios 1 :2 long et 1 :4 long. La méthode de normalisation n'a pas pu être appliquée pour ces résultats, seule la soustraction du bruit de fond moyen de chaque plot a été effectuée. Le témoin négatif n'a également pas pu être injecté pour évaluer la spécificité de la détection.

Le protocole appliqué est le même que celui du chapitre IV. Les paramètres utilisés lors de ces expérimentations sont les suivants :

- Concentration des biorécepteurs : 0,4 mg/mL.
- Concentration de la cible : 10 µg/mL et 1 µg/mL.
- Volume déposé : 990 pL.
- Temps d'injection : 20 min.
- Débit 50 µL/min.
- Volume d'échantillon injecté : 1 mL.
- Temps d'intégration : 8 000 ms.

Les résultats présentés dans la Figure V.15 montrent donc que pour toutes les conditions testées, les valeurs de fluorescence dépendent de la concentration des anticorps cibles (anti-lapin AF488), confirmant la capture spécifique des anticorps cibles de façon dose-dépendante.

Pour les deux conditions, l'intensité de fluorescence décroît lorsque la concentration de la cible diminue avec un niveau de fluorescence 4 fois moins intense pour le ratio 1 :2 et 2 fois moins intense pour le ratio 1 :4 (Figure V.16). Ce résultat met en évidence une capture spécifique des anticorps cibles AF488 de façon dose-dépendante. Le seuil Sbf (3σ) a été calculé à partir du bruit de fond moyen de chaque canal avant injection de la cible pour chaque ratio. Il est respectivement de 4,5 U.A et 5,4 U.A pour les ratios 1 : 2 et 1 :4. Après injection de la cible à 1 µg/mL, les valeurs d'intensité de fluorescence sont 4 fois plus élevées que le Sbf pour le ratio 1 :2 et 7 fois plus élevées pour le ratio 1 :4. Les signaux de fluorescence sont donc largement au-dessus du bruit de fond moyen. De plus, ces résultats suggèrent que le ratio 1 :4 présente une réactivité légèrement plus élevée que pour le ratio 1 :2 et plus particulièrement

pour une concentration de cible de 1 µg/mL. Cela peut être dû à une meilleure accessibilité ou densité des sites actifs présents sur la surface du biocapteur. Malgré l'absence de normalisation et de témoin négatif, ces résultats démontrent que les surfaces silanisées sont compatibles avec des conditions statiques et dynamiques de biocapture. Le protocole couplant silanisation de surface éco-responsable et immobilisation orientée par chimie click est donc prometteur, bien que des analyses complémentaires et une optimisation du protocole doivent être réalisées pour comparer avec précision les différentes conditions étudiées et sélectionner celle qui offrira de meilleures performances pour le biocapteur.

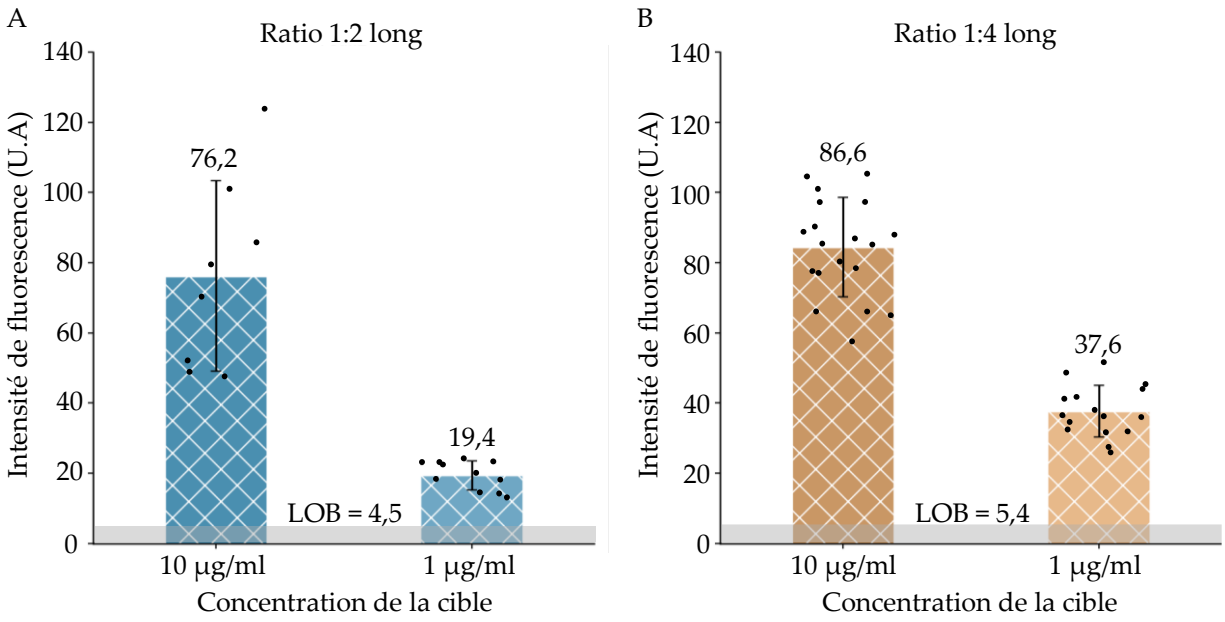


Figure V.16 : Graphiques représentant les niveaux de fluorescence en fonction de deux concentrations de cible (anticorps anti-lapin AF488) injectée à 50 µL/min pendant 20 min pour les ratios 1 :2 et 1 :4 long.

V.3 Discussion

Les résultats obtenus montrent que le protocole de silanisation éco-responsable, développé avec l'éthanol comme solvant, permet la fonctionnalisation de surface de silicium et est compatible avec une immobilisation orientée d'anticorps par chimie click SPAAC. Les caractérisations XPS ont confirmé la présence des silanes PEG-DBCO et silanes PEG-OH pour les 6 conditions de silanisation (ratios 1 :1, 1 :2 et 1 :4 et des longueurs de chaîne PEG courtes et longues pour le silane-PEG-DBCO). La réactivité chimique de ces surfaces fonctionnalisées vis-à-vis de la chimie click a été validée ainsi que la réactivité biologique des anticorps immobilisés par chimie click pour la détection des biomolécules cibles. Ces premiers résultats sont encourageants, mais il est nécessaire de les confirmer et d'approfondir les caractérisations.

Pour les tests de réactivité biologique réalisés en conditions statiques, le protocole mis en place a permis de valider la réaction de chimie click avec une méthode simple. Cependant ce protocole présente de nombreuses limites. Les quatre concentrations d'anticorps anti-lapin

AF488 (cible) utilisées ont été testées sur un même substrat, ce qui a pu amener des contaminations entre les zones de détection. De plus, lors du dépôt des solutions via des lamelles de verre, des bulles peuvent se former et empêcher une répartition homogène de la cible sur la surface. Ces lacunes peuvent expliquer certains résultats peu cohérents comme pour les ratios 1 :2 court et long. C'est pourquoi nous avons utilisé la plateforme optofluidique pour réaliser ce protocole de manière automatisée et dans des conditions en flux.

L'étude de la réactivité dans des conditions en flux avec la plateforme optofluidique montre que les surfaces silanisées sont bien fonctionnelles dans des conditions dynamiques. Les signaux de fluorescence, mesurés après injection de la cible pendant 20 min à un débit de 50 µL/min, sont largement au-dessus du seuil SB et indiquent une réponse dose-dépendante du biocapteur. Cependant, ces tests ont été réalisés seulement pour deux conditions (ratio 1 :2 et 1 :4 long) et une seule fois chacune. Les silanisations de surface ont été réalisées à l'INL et la réactivité biologique a été effectuée au CEA Leti. Le transport des substrats a pu altérer partiellement les silanisations, ce qui pourrait expliquer certaines variations expérimentales. La forme non homogène des plots de détection, en « donut », observée lors de l'analyse des résultats, suggère une évaporation des plots d'anticorps de capture. Une optimisation du volume déposé et de l'incubation des anticorps de capture doit être effectuée pour éviter ce phénomène de « donut » et ainsi améliorer la fiabilité des mesures de fluorescence. Pour améliorer les performances de la biocapture, la concentration d'anticorps de capture et le volume déposé peuvent également être optimisés. Dans le chapitre IV, nous avons montré que la concentration d'anticorps de capture influence fortement les résultats de biodétection. Pour les tests présentés dans ce chapitre, la concentration de biorécepteurs est de 0,4 mg/mL contre 1 mg/mL dans le chapitre IV et la taille des plots est de 140 µm contre 250 µm. La différence de taille pour un même volume déposé (990 pL) provient du fait que les anticorps non azidés sont dans du PBS 1X, alors que les anticorps azidés sont dans un tampon Tris 1X qui est plus volatile. Le protocole qui a été appliqué n'est donc pas optimal et peut encore être amélioré. De plus, il faudrait ajouter un contrôle interne pour comparer les substrats entre eux, ainsi qu'un témoin négatif sur chaque substrat et des anticorps de capture non azidés.

L'absence de témoin négatif rend également l'interprétation des résultats plus difficile, car il n'est pas possible de vérifier précisément la spécificité de la biodétection. Il serait donc intéressant de refaire ces expérimentations en ajoutant un substrat non silanisé comme témoin ainsi que des anticorps non modifiés pour comparer l'immobilisation par chimie click et une absorption sur la surface. Pour comparer les substrats entre eux et déterminer la meilleure fonctionnalisation, un contrôle interne doit également être ajouté.

L'étude des différents ratios silane-PEG-DBCO/silane-PEG-OH et de la longueur de la chaîne PEG du silane-PEG-DBCO montre que l'encombrement stérique joue un rôle important dans la formation de la couche de silane. Les analyses XPS suggèrent que les chaînes PEG longues conduisent à une densité de greffage plus faible, tandis que les analyses par fluorescence semblent montrer que l'utilisation d'un silane diluant favorise une meilleure accessibilité des fonctions DBCO. L'absence de normalisation et de contrôle interne ne permet pas de conclure cette étude.

Dans l'ensemble, ce travail a montré que la silanisation de surface en phase liquide dans de l'éthanol combinée à une immobilisation orientée par chimie click constitue une approche prometteuse dans une démarche de chimie verte. Cependant, des expériences complémentaires, incluant des contrôles adaptés, une meilleure maîtrise des conditions de dépôt et la répétition des essais, seront nécessaires pour optimiser le protocole et déterminer de manière fiable les conditions de fonctionnalisation les plus performantes pour l'application au biocapteur.

Résumé du Chapitre V

- Une étude bibliographique a été réalisée pour analyser les paramètres réactionnels influençant la réaction de silanisation. Cette étude a servi de point de départ dans l'élaboration d'un protocole de silanisation éco-responsable à partir d'éthanol.

- Ce protocole a été développé au début de cette thèse puis a été optimisé grâce au travail d'Yvana Kouatche.

- Il a ensuite été adapté pour travailler avec le silane-PEG-DBCO pour réaliser une réaction de chimie click SPAAC.

- Plusieurs conditions de silanisation ont été étudiées, dont des mélanges de silane-PEG-DBCO et silane-PEG-OH avec plusieurs ratios différents (1 :1,1 :2 et 1 ,4) et des longueurs de chaîne PEG différentes (3400 Da et 2000 Da) pour le silane-PEG-DBCO.

- Ces conditions ont été caractérisées par une analyse de l'angle de contact et une analyse XPS. Les résultats d'XPS ont démontré la fonctionnalité du protocole de silanisation en suggérant que les chaînes PEG longues permettent d'obtenir une seule couche de silane greffée sur la surface.

- Les caractérisations de la réaction de chimie click et de la réactivité biologique ont montré que le protocole était fonctionnel pour une application de biodétection dans des conditions en statique, pour des concentrations de cibles de 10 µg/mL, 1 µg/mL, 100 ng/mL et 10 ng/mL et dans des conditions en flux pour des concentrations de 10 µg/mL et 1 µg/mL. À l'aide de la plateforme, nous avons pu voir que le ratio 1 :4 semble plus performant que le ratio 1 :2 avec des chaînes PEG longues pour le silane-PEG-DBCO.

- Cette étude a validé le protocole de fonctionnalisation de surface éco-responsable mais des améliorations doivent être mises en place pour comparer efficacement les conditions de silanisation et obtenir un protocole optimal.

Conclusion et Perspectives

Les organoïdes-sur-puce sont des modèles de culture biologique complexes, qui reposent pourtant encore majoritairement sur des méthodes d'analyse conventionnelles. Le chapitre I a montré que ces méthodes présentent des limites pour l'analyse des organoïdes-sur-puce, soulignant ainsi la nécessité de développer de nouvelles méthodes d'analyse plus adaptées, notamment pour l'étude des sécrétions des organoïdes. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des biocapteurs pour pallier ces limitations actuelles. Cependant, développer une plateforme intégrant la culture d'organoïdes et des biocapteurs pour leur suivi en continu des paramètres physiologiques reste un défi technologique. Ainsi, l'objectif de cette thèse a été de développer une plateforme optofluidique intégrant un biocapteur optique basé sur la fluorescence pour une détection totalement automatisée et optimisée de biomolécules fluorescentes, dans un premier temps, puis d'insuline pour un futur suivi d'organoïdes de pancréas.

Dans le chapitre III, le système microfluidique intégrant un biocapteur optique en silicium a été présenté et caractérisé. Les architectures microfluidiques mises en place ont été conçues pour assurer la gestion de plusieurs échantillons et réactifs, ce qui a permis d'élaborer des protocoles de biodétection automatisés et versatiles, capables de réaliser jusqu'à 7 détections successives sur un même biocapteur, pour des cibles marquées ou non marquées. L'intégration amovible du biocapteur, reposant sur un système de serrage mécanique associé à un joint en silicone, permet la réutilisation des cartouches microfluidiques et contribue ainsi à la réduction des déchets générés au cours de cette thèse. Durant ce projet, chaque architecture a été testée avec une seule cartouche, ce qui correspond au total à trois cartouches microfluidiques utilisées. Concernant les joints en silicone, seuls deux exemplaires ont été nécessaires, un pour chaque type d'actionnement. Par ailleurs, cette stratégie d'intégration a démontré une excellente étanchéité, aucune fuite n'ayant été observée lors des expérimentations, y compris pour des durées supérieures à 7 heures consécutives. L'intégration modulaire développée s'est donc révélée très robuste avec une majorité du système qui est réutilisable, à l'exception du biocapteur. Cette approche s'inscrit dans une perspective plus large de conception durable des dispositifs biomédicaux, en réponse aux enjeux actuels de réduction de l'empreinte environnementale des technologies pour la Santé, en cohérence avec les principes du Safe and Sustainable-by-Design (SSbD) et de l'économie circulaire. Deux types d'actionnement fluidiques, mis en place pendant cette thèse, ont également été présentés dans ce chapitre : un actionnement en flux continu à l'aide d'un contrôleur en pression et un actionnement par cycle péristaltique à partir d'une micropompe intégrée dans l'architecture microfluidique.

L'actionnement en flux continu permet d'avoir un débit constant au cours du temps. Toutefois, il s'est avéré instable à de faibles débits en raison de sa sensibilité aux bulles d'air. Les premières caractérisations fluidiques de l'actionnement péristaltique ont montré que cette approche est reproductible avec des coefficients de variation inférieurs à 2,3 %. Un phénomène de reflux a été observé lors de l'actionnement des micro-pompes, particulièrement marqué pour la plus petite pompe, pour laquelle la phase de reflux représente près de 56 % de la phase d'injection. Une étude plus approfondie doit être effectuée afin de caractériser précisément l'écoulement et le débit de cet actionnement ainsi que pour évaluer l'effet du reflux sur les performances de biodétection.

Dans le chapitre IV, l'actionnement en flux continu a été employé pour valider les protocoles de biodétection mis en place avec la plateforme optofluidique. Les résultats d'immunodétection ont montré des reproductibilités intra-canal, inter-canal et inter-capteur correctes, avec des valeurs maximales de coefficient de variation de 11,3 %, 12,4 % et 10,8 % respectivement. Le premier protocole a permis d'étudier les paramètres influençant les performances du biocapteur afin de mieux comprendre leur effet et d'optimiser la biocapture. Cette analyse a montré que les paramètres liés au dépôt des anticorps de capture (concentration et volume) ainsi que le temps d'injection avaient un effet important sur les résultats de biocapture. Concernant le débit d'injection, des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour déterminer son influence. Avec cette plateforme optofluidique, une concentration de 100 ng/ml (667 pM) d'anticorps cibles a pu être détectée après 6 minutes d'injection d'un volume de 300 µl, ce qui est comparable aux performances rapportées dans la littérature pour ce type de cible. Ce résultat devra être reproduit avec un contrôle négatif afin de valider la limite de détection du système. Une première validation encourageante a également été réalisée pour la détection d'insuline, à partir d'une détection en sandwich.

En parallèle de ces développements, une nouvelle fonctionnalisation de surface éco-responsable a été mise en place et a été présentée dans le chapitre V. Ce protocole combine une silanisation de surface en phase liquide utilisant un solvant vert, l'éthanol, avec une réaction de chimie click bio-orthogonale, compatible avec les principes de la chimie verte. Les premiers résultats sont encourageants avec la validation de la réactivité biologique entre les anticorps de capture immobilisés et leurs cibles à une concentration de 1 µg/ml. Cependant le protocole doit être optimisé pour améliorer les performances du biocapteur.

Dans l'ensemble, la plateforme a démontré ses capacités de versatilité, en offrant la possibilité d'adapter le protocole de biodétection par rapport aux objectifs souhaités (détection de fluorescence directe ou indirecte). Les paramètres expérimentaux peuvent être ajustés, en particulier le temps d'injection avec l'injection séquentielle des échantillons, ce qui permet d'adapter le temps d'injection de la cible jusqu'à ce qu'elle soit détectable. La plateforme a également montré certaines limitations, notamment avec l'actionnement en flux continu sensible aux bulles d'air, ce qui a conduit au développement d'une nouvelle architecture qui intègre une micro-pompe. D'autres améliorations sont envisageables. Tout d'abord, le montage d'épifluorescence utilisé pour le banc optique provient d'un kit pour le fluorochrome GFP. Le filtre d'émission n'est donc pas parfaitement adapté à l'AlexaFluor 488 utilisé dans ce

projet et ne transmet pas la plage des longueurs d'onde maximales de son spectre d'excitation. La sensibilité du système optique peut donc être améliorée. En outre, l'objectif de la caméra présente un grossissement de 0,1 permettant de visualiser l'ensemble de la cartouche au détriment de la résolution spatiale, qui pourrait être améliorée en utilisant un objectif de plus fort grossissement. Enfin, l'utilisation d'une caméra 16 bits, au lieu d'une caméra 8 bits, permettrait de capter un plus grand nombre de niveaux d'intensité et offrirait donc une meilleure sensibilité pour la détection des variations de fluorescence ainsi que pour quantifier plus précisément les signaux.

En ce qui concerne la méthode de transduction, le choix de la fluorescence a permis d'établir les protocoles avec la plateforme optofluidique, cependant cette méthode a également montré ses limitations. Pour la détection en sandwich, le recours à des anticorps secondaires fluorescents ajoute des étapes supplémentaires au protocole de biodétection. De plus, les anticorps doivent être marqués à l'aide de kits, ce qui entraine une diminution de leur concentration par rapport à la solution initiale. La nécessité de recourir à une référence interne pour normaliser et comparer les résultats constitue également une limitation importante, qui complexifie l'analyse et la comparaison des données. Idéalement, il serait souhaitable de disposer d'une référence stable dans le temps et qui ne présente pas de phénomènes de saturation. Les recherches visant à identifier un contrôle interne approprié doivent être poursuivies pour continuer d'exploiter cette méthode de transduction. La quantification de la fluorescence est également un point technique qui n'a pas pu être étudié plus en profondeur car elle nécessite l'utilisation d'une gamme de quantification qui ne subit pas les effets de saturation optique. Il en est de même pour le multiplexage, qui n'a pas été exploité pendant cette thèse et qui permettrait la détection simultanée de plusieurs cibles dans un même échantillon. Cependant sa mise en œuvre est complexe avec une détection par fluorescence, car elle nécessiterait l'utilisation de plusieurs fluorophores de longueurs d'onde bien distinctes ainsi qu'une modification du banc optique pour réaliser le multiplexage dans un même canal. Ces problèmes mettent en évidence les limites des biocapteurs avec marquage et incitent à s'orienter vers des biocapteurs sans marquage tels que les cristaux photoniques ou les interféromètres pour les développements futurs.

La méthode d'intégration du capteur présente également des marges d'amélioration. L'utilisation d'une fenêtre en verre percée, nécessaire pour assurer la compatibilité de la cartouche avec une détection par fluorescence, reste contraignante. En raison du coût élevé de la fabrication, cette pièce ne se prête pas au prototypage rapide et impose de valider la conception avant toute production. Pour dépasser cette limitation, une première tentative d'intégration d'une lame de verre a été modélisée sur SolidWorks. Cependant, cette approche n'a pas encore été testée en conditions expérimentales et mériterait d'être explorée pour proposer une solution alternative plus simple et adaptée au prototypage rapide.

Pendant cette thèse, nous nous sommes principalement concentrés sur le développement de cette intégration modulaire pour réduire l'utilisation de cartouches microfluidiques. Cependant, les capteurs en silicium sont une des plus grandes sources de pollution de ce projet, avec un fort impact environnemental. À ce jour, la plateforme optofluidique présente une polyvalence suffisante pour intégrer un protocole de régénération

des biocapteurs directement au sein des cartouches. Cette étape n'a pas pu être mise en place au cours de cette thèse, mais elle pourrait être envisagée à l'avenir pour réduire l'impact environnemental de la recherche, dans un souci d'éco-innovation.

La silanisation de surface en phase liquide demande l'utilisation de volumes importants de solvant et de réactifs. Pour limiter ces quantités, il serait également envisageable de réaliser la silanisation directement dans la cartouche microfluidique, en utilisant un joint en silicone adapté. Cette approche permettrait de réduire à la fois les déchets et les coûts liés à la fonctionnalisation chimique de surface.

À ce stade, le système microfluidique actuel n'intègre pas la culture d'organoïdes. Une première CAO a été conçue et est présentée sur la Figure C-1. Dans cette configuration, la cartouche microfluidique serait composée, dans un premier temps, d'une culture d'organoïde dans un serpentin (Quintard *et al.*), perfusée grâce à une micro-pompe intégrée. Les sécrétions seraient ensuite collectées dans des chambres avant d'être injectées dans les zones de détection du biocapteur. Cette architecture pourrait servir dans un premier temps à lever les verrous techniques associés à la gestion des sécrétions et à la mise en place d'un test de stimulation au glucose (GSIS) sur puce.

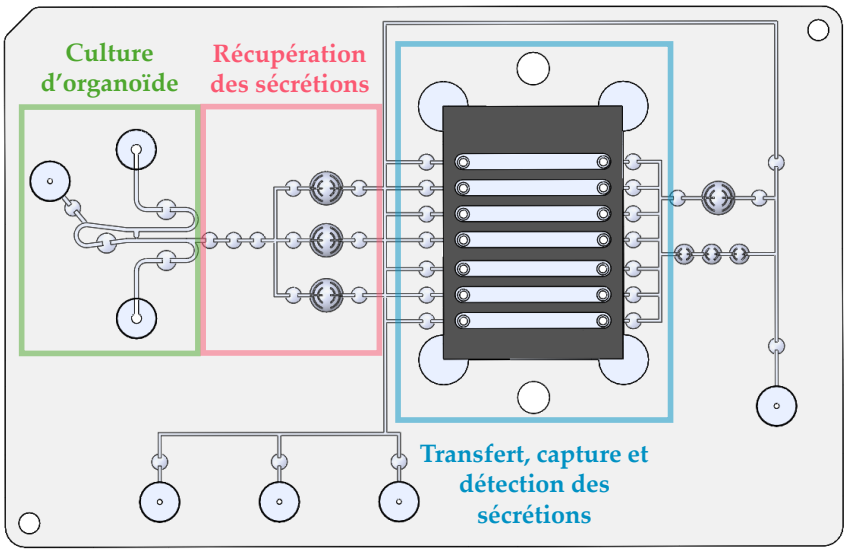


Figure.C-1 : Architecture d'une cartouche microfluidique intégrant culture d'organoïde, récupération des sécrétions et leur analyse via un biocapteur.

La mise au point d'une plateforme complète, intégrant à la fois la culture d'organoïdes et l'analyse de leurs sécrétions, nécessite de repenser l'intégration du biocapteur. En effet, bien que la méthode d'intégration soit très efficace, elle requiert plusieurs étapes d'assemblages minutieuses pour garantir l'étanchéité du système. Dans le cas d'un capteur non réutilisable, il est essentiel de disposer d'une méthode simple et rapide pour pouvoir interchanger les capteurs et poursuivre le suivi des sécrétions des organoïdes. Actuellement, au sein du laboratoire LSMB, certains organoïdes-sur-puce sont composés d'un « fluidic circuit board » (FCB), qui correspond à un support microfluidique réutilisable et qui utilise des modules aimantés de type « plug and play », intégrant l'organoïde. Ces modules sont facilement amovibles. Une nouvelle intégration de capteur pourrait donc être imaginée à partir de ces

modules, afin de simplifier son utilisation pour les biologistes. Cette approche est également un moyen de réduire les déchets, dans une logique d'éco-innovation, tout en restant compatible avec le développement d'un protocole de régénération des biocapteurs.

À terme, la mise en œuvre d'une plateforme permettant la culture et le suivi de plusieurs organoïdes en parallèle peut être envisagée afin de faciliter l'étude de la reproductibilité de ces modèles. Pour automatiser la culture simultanée de plusieurs organoïdes, l'utilisation d'une micro-pompe comme méthode d'actionnement serait un avantage pour conserver un système relativement compact. Actuellement, au CEA Leti, des chercheurs développent des cartouches microfluidiques au format plaque à puits, composées de 12 modules de culture. Cela ouvre la voie à la conception d'une plateforme composée de plusieurs modules de culture, associés à des modules de biodétection intégrant des biocapteurs. Ce projet de thèse a donc contribué à apporter les premières briques technologiques pour le développement de plateformes combinant culture d'organoïdes et biocapteurs, en vue d'améliorer la reproductibilité, la sensibilité et la durabilité des études biologiques.

Annexes

Annexe A

Code Python pour l'acquisition des données de fluorescence

```
"""
Traitement de l'intensité des spots de fluorescence
 sur les différents canaux (colonnes) de détection

"""
import numpy as np
import pandas as pd
from skimage.measure import regionprops_table
from skimage.draw import disk as dsk

# ---------- Masque de référence (Cellpose + cercles standard) ----------
"""
Génère un masque de référence à partir de la première image sélectionnée
(utile si plusieurs fois le même canal à analyser)

Return :
masque_cercles : ndarray
Masque de spots sous forme de disques normalisées
"""

def mask_first(columns_list, rayon_offset_val, model, diameter=10,
channels=[[0, 0]]):
    """Segmenter ref + construire un masque de cercles standardisés."""
    ref_img, _ = columns_list[0]
    mask_ref_local, _, _, _ = model.eval([ref_img], diameter=diameter,
channels=channels)
    mask_ref_local = mask_ref_local[0]

    # Propriétés des régions (centroïdes et diamètres équivalents)
    props = ['centroid', 'equivalent_diameter']
    table = regionprops_table(mask_ref_local, properties=props)

    diameters = table['equivalent_diameter']
    mean_radius = (np.mean(diameters) / 2) - rayon_offset_val
    if not np.isfinite(mean_radius) or mean_radius <= 1:
        mean_radius = max(2, int(np.nanmean(diameters) / 2) if len(diameters)
else 4)

    print(f"Rayon utilisé pour les cercles : {mean_radius} pixels")
    #Construction du masque final avec des cercles
```

```
    masque_cercles = np.zeros_like(mask_ref_local, dtype=np.uint8)
    coords_y = table['centroid-0']
    coords_x = table['centroid-1']

    for i, (y, x) in enumerate(zip(coords_y, coords_x), start=1):
        rr, cc = dsk((y, x), radius=mean_radius, shape=masque_cercles.shape)
        masque_cercles[rr, cc] = i

    return masque_cercles


# ---------- Segmentation / mesures / exports ----------

def segment_columns(
    columns_list,
    mask_ref_local,
    facteur=1.0,
    *,
    # --- Réglages en pixels (faciles à comprendre) ---
    LEFT_OFFSET_X_PX=25,        # plus grand => les disques de gauche vont
plus à gauche
    RIGHT_OFFSET_X_PX=25,       # plus grand => les disques de droite vont
plus à droite
    OFFSET_Y_TOP_PX=10,         # distance au-dessus du spot
    OFFSET_Y_BOTTOM_PX=10,      # distance en-dessous du spot
    BG_SAMPLE_RADIUS=6,         # rayon des petits disques bleus (fond)
    SIDE_THRESHOLD=3            # tolérance autour de l'axe médian pour
décider gauche/droite
):
    """
    Calcule les props par spot et sauvegarde images/Excel.
    Correction de fond avec 2 disques latéralisés (gauche OU droite) +
décalages en PIXELS.
    Exporte :
      - mean_intensity_corr_mean           = I - bg
      - mean_intensity_corr_mean_factored  = (I - bg) * facteur
      - mean_intensity_corr_norm_img       = (I - bg) / mean(I - bg) de
l'image/colonne
    Dessine 2 cercles bleus par spot (haut/bas) uniquement du côté latéral du
spotpour effectuer la soustraction du bruit de fond
    """
    import matplotlib.pyplot as plt
    from matplotlib.patches import Circle

    plt.ioff()

    global file_counter, final_result_df, final_result_corr_df
    global final_result_norm_imgmean_df, image_path2, image_path
```

```
    global final_result_corr_factored_df

    all_dfs = []
    all_mean_intensities = []
    all_mean_intensities_corr = []
    all_mean_intensities_corr_factored = []
    all_mean_intensities_norm_img = []

    intensity_means = {}
    timestamp = datetime.now().strftime("%Y%m%d_%H%M%S")
    image_name_base = os.path.splitext(os.path.basename(image_path2))[0]

    output_dir = os.path.join(os.path.dirname(image_path),
"segmented_columns")
    os.makedirs(output_dir, exist_ok=True)

    for i, (img_column, coords) in enumerate(columns_list, start=1):
        # -- Propriétés des régions
        props = ['label', 'mean_intensity', 'centroid', 'equivalent_diameter']
        labels = regionprops_table(mask_ref_local, intensity_image=img_column,
properties=props)
        df = pd.DataFrame(labels)
        df['column_index'] = i + 1

        if not pd.api.types.is_numeric_dtype(df['equivalent_diameter']):
            df['equivalent_diameter'] =
pd.to_numeric(df['equivalent_diameter'], errors='coerce')

        mean_diameter = df['equivalent_diameter'].mean()
        threshold = mean_diameter * 0.8  # >= 80% de la moyenne
        filtered_df = df[df['equivalent_diameter'] >= threshold].copy()

        # -- Fond local : 2 disques du côté gauche ou droit
        h, w = img_column.shape[:2]
        im = img_column.astype(float)
        exclude_mask = (mask_ref_local > 0)

        mid_x = w / 2.0  # axe médian (en colonnes)

        bg_means = []
        for _, row in filtered_df.iterrows():
            cy = int(round(row['centroid-0']))
            cx = int(round(row['centroid-1']))

            # Détermination du côté (gauche/droite) par rapport à mid_x
            if cx < (mid_x - SIDE_THRESHOLD):
                # Spot côté gauche → on place les disques à GAUCHE
                dx = -int(abs(LEFT_OFFSET_X_PX))
```

```
            elif cx > (mid_x + SIDE_THRESHOLD):
                # Spot côté droit → on place les disques à DROITE
                dx = int(abs(RIGHT_OFFSET_X_PX))
            else:
                # Trop proche du centre : par défaut on met à DROITE
                dx = int(abs(RIGHT_OFFSET_X_PX))

            # Positions des 2 centres (haut / bas) avec décalages verticaux
indépendants
            centers = [
                (cy - int(abs(OFFSET_Y_TOP_PX)),  cx + dx),   # disque haut
                (cy + int(abs(OFFSET_Y_BOTTOM_PX)), cx + dx)  # disque bas
            ]

            # Masque d'échantillonnage
            sample_mask = np.zeros((h, w), dtype=bool)
            for (yy, xx) in centers:
                rr, cc = dsk((yy, xx), radius=int(max(1, BG_SAMPLE_RADIUS)),
shape=(h, w))
                sample_mask[rr, cc] = True

            # Exclure les pixels appartenant aux spots
            sample_mask &= ~exclude_mask

            vals = im[sample_mask]
            bg_means.append(np.nan if vals.size == 0 else
float(np.mean(vals)))

        filtered_df['bg_mean'] = bg_means
        filtered_df['mean_intensity_corr_mean'] =
filtered_df['mean_intensity'] - filtered_df['bg_mean']
        filtered_df['mean_intensity_corr_mean_factored'] =
filtered_df['mean_intensity_corr_mean'] * float(facteur)

        mean_global = filtered_df['mean_intensity_corr_mean'].mean()
        if not np.isfinite(mean_global) or mean_global == 0:
            mean_global = 1.0
        filtered_df['mean_intensity_corr_norm_img'] =
filtered_df['mean_intensity_corr_mean'] / mean_global

        # --- Agrégations pour les exports globaux
        all_dfs.append(filtered_df)
        all_mean_intensities.append(filtered_df[['mean_intensity']])
        all_mean_intensities_corr.append(filtered_df[['mean_intensity_corr_mea
n']])
        all_mean_intensities_corr_factored.append(filtered_df[['mean_intensity
_corr_mean_factored']])
        all_mean_intensities_norm_img.append(filtered_df[['mean_intensity_corr
_norm_img']])
```

```
        intensity_means[f'channel_{i}'] =
[filtered_df['mean_intensity'].mean()]

        # --- Figure annotée (contours + disques)
        fig, ax = plt.subplots()
        ax.imshow(img_column, cmap='gray')

        mask_filtered = np.isin(mask_ref_local, filtered_df['label'])
        ax.contour(mask_filtered, colors='red', linewidths=0.9)

        # Redessiner les 2 disques côté gauche/droit pour chaque spot
        for _, row in filtered_df.iterrows():
            y = float(row['centroid-0']); x = float(row['centroid-1'])

            # même logique que ci-dessus pour le côté
            if x < (mid_x - SIDE_THRESHOLD):
                dx = -int(abs(LEFT_OFFSET_X_PX))
            elif x > (mid_x + SIDE_THRESHOLD):
                dx = int(abs(RIGHT_OFFSET_X_PX))
            else:
                dx = int(abs(RIGHT_OFFSET_X_PX))

            cy_top    = y - int(abs(OFFSET_Y_TOP_PX))
            cy_bottom = y + int(abs(OFFSET_Y_BOTTOM_PX))
            cx_side   = x + dx

            ax.add_patch(Circle((cx_side, cy_top),    int(max(1,
BG_SAMPLE_RADIUS)),
                                fill=False, edgecolor='blue', linewidth=1.0,
alpha=0.95))
            ax.add_patch(Circle((cx_side, cy_bottom), int(max(1,
BG_SAMPLE_RADIUS)),
                                fill=False, edgecolor='blue', linewidth=1.0,
alpha=0.95))

        for y, x, number in zip(filtered_df['centroid-0'],
filtered_df['centroid-1'], filtered_df['label']):
            ax.text(x, y, str(number), color='white', fontsize=8)
        ax.set_aspect('equal')

        save_path = os.path.join(output_dir,
f"{image_name_base}_column_{i}_{timestamp}.jpg")
        plt.savefig(save_path, dpi=150, bbox_inches='tight')
        plt.close(fig)

    # --- Assemblage global / exports par image
    if not all_dfs:
        print("Aucune donnée de segmentation à sauvegarder.")
        return
```

```
    combined_df = pd.concat(all_dfs, ignore_index=True)
    result_df2 = pd.concat(all_mean_intensities, axis=1)
    result_corr_df = pd.concat(all_mean_intensities_corr, axis=1)
    result_corr_factored_df = pd.concat(all_mean_intensities_corr_factored,
axis=1)
    res_img_norm_df = pd.concat(all_mean_intensities_norm_img, axis=1)

    # globals
    global final_result_df, final_result_corr_df,
final_result_corr_factored_df, final_result_norm_imgmean_df
    final_result_df = pd.concat([final_result_df, result_df2], axis=1,
ignore_index=True)
    final_result_corr_df = pd.concat([final_result_corr_df, result_corr_df],
axis=1, ignore_index=True)
    final_result_corr_factored_df = pd.concat([final_result_corr_factored_df,
result_corr_factored_df], axis=1, ignore_index=True)
    final_result_norm_imgmean_df = pd.concat([final_result_norm_imgmean_df,
res_img_norm_df], axis=1, ignore_index=True)

    # Excel par image
    excel_dir = os.path.join(os.path.dirname(image_path), "segmented_columns")
    os.makedirs(excel_dir, exist_ok=True)
    image_name_base = os.path.splitext(os.path.basename(image_path2))[0]
    timestamp = datetime.now().strftime("%Y%m%d_%H%M%S")

    excel_save_path = os.path.join(excel_dir,
f"{image_name_base}_file_{file_counter}_column_properties_.xlsx")
    combined_df.to_excel(excel_save_path, index=False)
    print(f"Propriétés des colonnes sauvegardées à : {excel_save_path}")

    try:
        minimal_cols = ['label', 'mean_intensity', 'bg_mean',
'mean_intensity_corr_mean']
        minimal_df = combined_df[minimal_cols].copy()
        bg_excel_path = os.path.join(excel_dir,
f"{image_name_base}_bg_summary_.xlsx")
        minimal_df.to_excel(bg_excel_path, index=False)
        print(f"Résumé fond local sauvegardé : {bg_excel_path}")
    except Exception as e:
        print(f"[WARN] Export Excel minimal : {e}")

    out_corr = os.path.join(excel_dir,
f"{image_name_base}_column_mean_intensities_corr_mean_.xlsx")
    result_corr_df.to_excel(out_corr, index=False)
    print(f"☑ Intensités corrigées sauvegardées à : {out_corr}")

    out_fact = os.path.join(excel_dir,
f"{image_name_base}_column_mean_intensities_corr_mean_factored_.xlsx")
```

```
    result_corr_factored_df.to_excel(out_fact, index=False)
    print(f"☑ Intensités corrigées × facteur sauvegardées à : {out_fact}")

    out_normimg = os.path.join(excel_dir,
f"{image_name_base}_column_mean_intensities_corr_norm_img_.xlsx")
    res_img_norm_df.to_excel(out_normimg, index=False)
    print(f"☑ Normalisation par moyenne d'image sauvegardée : {out_normimg}
```

Annexe B

Méthodes de prétraitement des données dans la littérature

- Correction locale du bruit de fond

La soustraction du bruit de fond est la méthode de prétraitement la plus couramment employée dans les études de biodétection par fluorescence [221], [222], [223]. Elle consiste à soustraire du signal brut I_{brut} l'intensité moyenne du fond local ou bruit de fond I_{bg} :

$$I_{corr} = I_{brut} - I_{bg}$$

Cette méthode est notamment couramment utilisée pour l'étude des biopuces à ADN (microarray). Plusieurs logiciels spécialisés (ScanAlyze, ImaGene, GenePix Pro, etc), permettant d'étudier ces puces, proposent différentes méthodes de récupération du bruit de fond local présentées sur la Figure A.1.

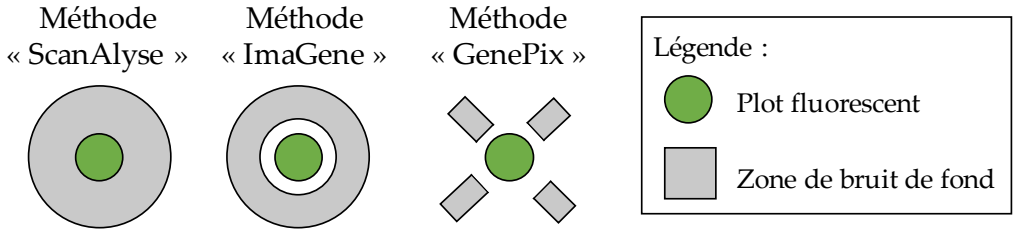


Figure A.1 : Méthodes de récupération du bruit de fond local pour trois logiciels spécialisés.

Cette soustraction du fond local permet d'éliminer les artefacts liés à de l'autofluorescence ou à de la diffusion de lumière parasite.

- Correction par l'image initiale

Une seconde méthode de prétraitement est la soustraction de l'image initiale I_0 avant la biocapture. Cette méthode est très utilisée pour les analyses temporelles ou cinétiques de fluorescence et soustrait le bruit de fond de départ à chaque image suivante :

$$I_{t_corr} = I_t - I_0 \quad (4)$$

Cela supprime l'autofluorescence initiale du support ou du milieu et permet de garder seulement la fluorescence réellement induite par l'expérimentation.

- Correction de champ plat (Flat field correction)

Cette méthode est utilisée pour corriger les inhomogénéités d'éclairage ou les variations du détecteur de la caméra, notamment pour la microscopie de fluorescence. Le principe repose sur l'utilisation d'une « image de champ plat » (flat field image). Cette image est souvent obtenue à partir de l'acquisition d'une image de fluorescence homogène, par exemple avec une solution de colorant fluorescent positionnée sur tout le champ de la caméra. Une image de fond noir est également prise pour représenter le bruit électronique du détecteur du système optique [224], [225].

L'image brute est corrigée sur chaque pixel à partir de ces deux acquisitions avec l'équation suivante :

$$I_{corr(x,y)} = \frac{I_{brute(x,y)} - D_{(x,y)}}{F_{(x,y)} - D_{(x,y)}} \times k \quad (5)$$

Avec :

$I_{brute(x,y)}$, l'intensité brute du pixel à la position (x, y).

$D_{(x,y)}$, l'intensité du pixel à la position (x, y) dans l'image de fond noir.

$F_{(x,y)}$, l'intensité du pixel à la position (x, y) dans l'image du champ plat.

k, un facteur de normalisation, souvent la moyenne ou la médiane de $F - D$.

Cette méthode corrige une illumination non uniforme ou les variations de sensibilité du détecteur.

Annexe C

Méthodes de normalisation et de standardisation dans la littérature

- Normalisation avec la mise à l'échelle Min-Max

La normalisation permet de mettre toutes les valeurs d'une image sur une même échelle. Avec la mise à l'échelle linéaire Min-Max, les valeurs sont comprises entre 0 et 1 grâce à l'équation :

$$I_{norm(x,y)} = \frac{I_{brute(x,y)} - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (6)$$

Avec :

$I_{brute(x,y)}$, l'intensité brute du pixel à la position (x, y).

I_{min}, la valeur d'intensité la plus faible.

I_{max}, la valeur d'intensité la plus forte.

Cette mise à l'échelle permet d'améliorer le contraste et de faciliter la comparaison entre les images, mais elle reste très sensible aux valeurs extrêmes (pixels saturés, bruit de fond), ce qui peut fausser les résultats.

- Normalisation des images par un marqueur de référence ou contrôle interne

Une autre approche consiste à normaliser le signal d'intérêt I_{brut} par rapport à une fluorescence de référence présente dans l'image. Par exemple, les instruments réalisant des PCR utilisent une référence passive, un marqueur fluorescent d'acide nucléique Carboxy-X-Rhodamine (ROX) comme référence interne [154], [155]. C'est un colorant inerte qui ne participe pas à l'amplification et fournit un signal stable tout au long de la réaction. Les données sont divisées par l'intensité de fluorescence du ROX.

En microscopie de fluorescence, Halter et *al.* ont proposé d'utiliser un matériau fluorescent (un verre Schott 475 GG ou un verre dopé à l'uranyle) comme référence interne pour corriger la dérive de l'instrument au cours du temps [156]. À chaque nouvelle prise d'images, l'intensité du verre de référence est mesurée et comparée à celle obtenue dans une condition de référence fixée comme ligne de base. Un facteur de correction est alors appliqué aux intensités brutes de l'image, selon l'équation :

$$I_{norm(x,y)} = I_{brute(x,y)} \times \frac{r_{ref,baseline}}{r_{ref,mes}} \times \frac{A}{A_{ref}} \quad (7)$$

Où $r_{ref,baseline}$ correspond à l'intensité du matériau fluorescent mesurée dans la condition de référence, $r_{ref,mes}$ à l'intensité mesurée lors de l'acquisition, et A et A_{ref} au nombre de pixels couvrant une même surface réelle dans chacune des configurations optiques. Cette méthode permet de compenser simultanément les fluctuations de la source lumineuse, les variations du détecteur et les changements de gain ou d'optique.

- Standardisation avec le score Z

La standardisation du score Z consiste à transformer une variable pour que sa moyenne devienne 0 et son écart-type devienne 1, selon l'équation suivante :

$$I_{z(x,y)} = \frac{I_{brute(x,y)} - \mu}{\sigma} \quad (8)$$

Où μ est la moyenne et σ l'écart-type des intensités de l'image. Cette transformation permet d'exprimer les intensités en termes d'écarts à la moyenne, facilitant la comparaison entre images présentant des distributions différentes. Elle est toutefois sensible aux valeurs extrêmes, qui influencent fortement la moyenne et l'écart-type.

- Standardisation avec l'échelle robuste (robust scaling)

Une autre alternative de standardisation consiste à utiliser une méthode fondée sur la médiane et l'intervalle interquartile, selon l'équation :

$$I_{robust(x,y)} = \frac{I_{brute(x,y)} - médiane}{Q_3 - Q_1} \quad (9)$$

Où Q_1 et Q_3 désignent les premiers et troisièmes quartiles. Cette méthode est adaptée aux signaux hétérogènes, car elle n'est pas influencée par les valeurs extrêmes et fournit une standardisation plus stable.

Après application de la mise à l'échelle Min-Max, de la standardisation avec le score Z et de l'échelle robuste, il est apparu que ces méthodes suppriment l'information associée aux intensités absolues et aux variations biologiques et ne permettent pas de corriger les biais liés aux conditions d'acquisition ou à l'instrumentation. Ces normalisations sont donc plus pertinentes à utiliser après correction des données pour comparer des variations relatives ou de distributions internes. Une correction par un contrôle interne fluorescent a donc été mise en place pour compenser les variations intrinsèques du système.

Annexe D

Principe d'une boîte à moustache (Boxplot)

Cette Annexe explique le principe d'une boîte à moustache ou bloxplot utilisée dans cette thèse.

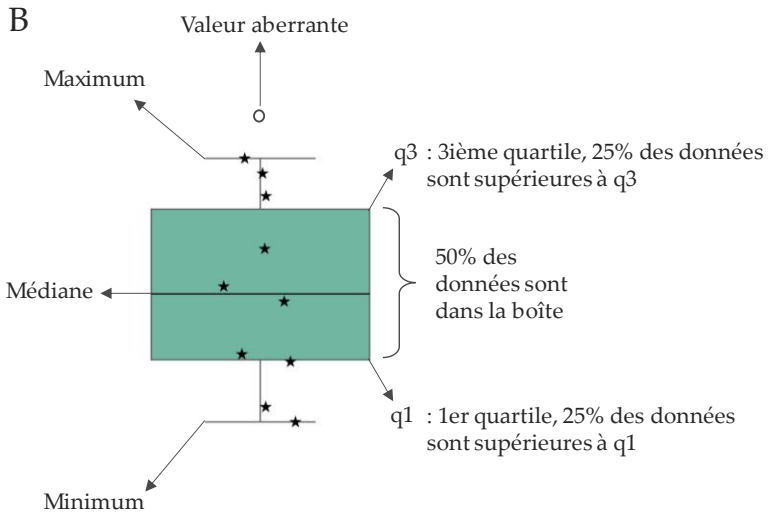


Figure A.2 : Principe d'une boîte à moustache (boxplot).

Annexe E

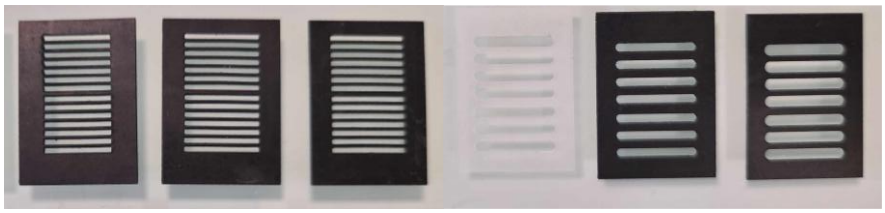
Tests pour l'assemblage modulaire du biocapteur

Cette Annexe présente les différents matériaux utilisés pour élaborer l'intégration modulaire et les résultats obtenus.

L'EPDM

La première approche a été d'utiliser des feuilles d'Ethylène-Propylène-Diène Monomère (EPDM) de 600 µm, pour réaliser le joint. Plusieurs formats ont été testés avec 14 ou 7 canaux de détection plus ou moins épais (Figure A.3-A). L'épaisseur, la forme, le matériau et la quantité d'écrous de la contre-bride ont également été modifiés, passant de 3 mm d'épaisseur à 4 mm, de 2 à 4 vis et du PMMA à l'aluminium, et couplés aux différents formats de joints en EPDM (Figure A.3-B). Aucune de ces combinaisons n'a permis d'obtenir un système étanche. Lorsque le liquide était injecté dans un canal de détection, une fuite était rapidement visible (Figure A.3-C).

A



B



C

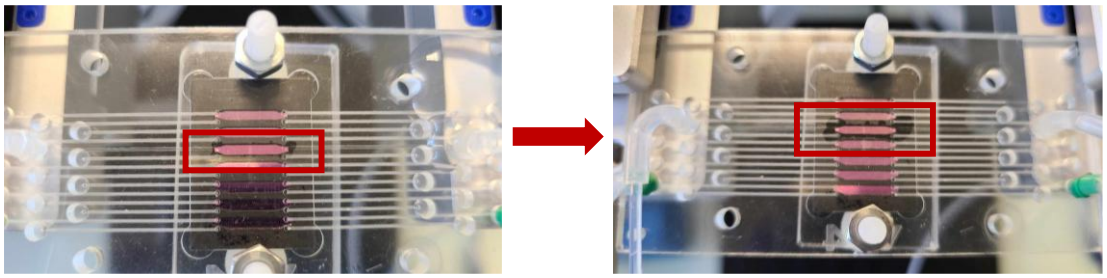


Figure A.3 : A- Différentes formes de joints en EPDM avec 14 ou 7 canaux, B- Différentes formes, épaisseurs et matériaux pour la contre-bride, C- Test fluidique avec un joint en EPDM, une fois l'injection faite, le liquide fuit à travers la cartouche.

L'écoflex

L'ecoflex a permis de rendre le système complètement étanche, comme on peut le voir sur la Figure A.4, où un colorant alimentaire bleu est injecté dans le système et aucune fuite

n'est visible. Cependant, on remarque également que la découpe de ce matériau est laborieuse et que le résultat final ne donne pas des canaux uniformes et symétriques.

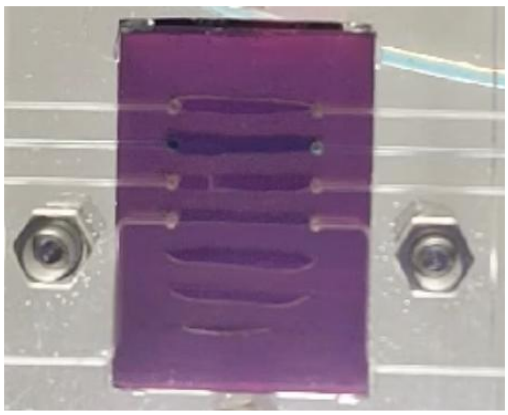


Figure A.4 : Visualisation de l'injection d'un colorant bleu dans la cartouche microfluidique, montrant l'étanchéité du système avec : A- Le joint en Ecoflex dont les canaux sont déformés, B- le joint en silicone moulé (MED6010) avec des canaux plus symétriques.

Annexe F

Caractérisation en pression de l'étanchéité du système fluidique

L'assemblage modulaire : joint/capteur/contre-bride, a été testé en fonctionnement à forte pression. Pour cela, un contrôleur de pression (Flow EZ, Fluigent) a été utilisé avec la cartouche microfluidique simplifiée. Ce contrôleur est relié à un réservoir pressurisé, lui-même connecté à la cartouche microfluidique (Figure A.5). Ce circuit permet de déplacer le liquide du réservoir dans le canal de la cartouche microfluidique. La cartouche microfluidique a été maintenue sous une pression de 1 bar pendant plus de 10 min, sans fuite confirmant l'étanchéité de l'assemblage.

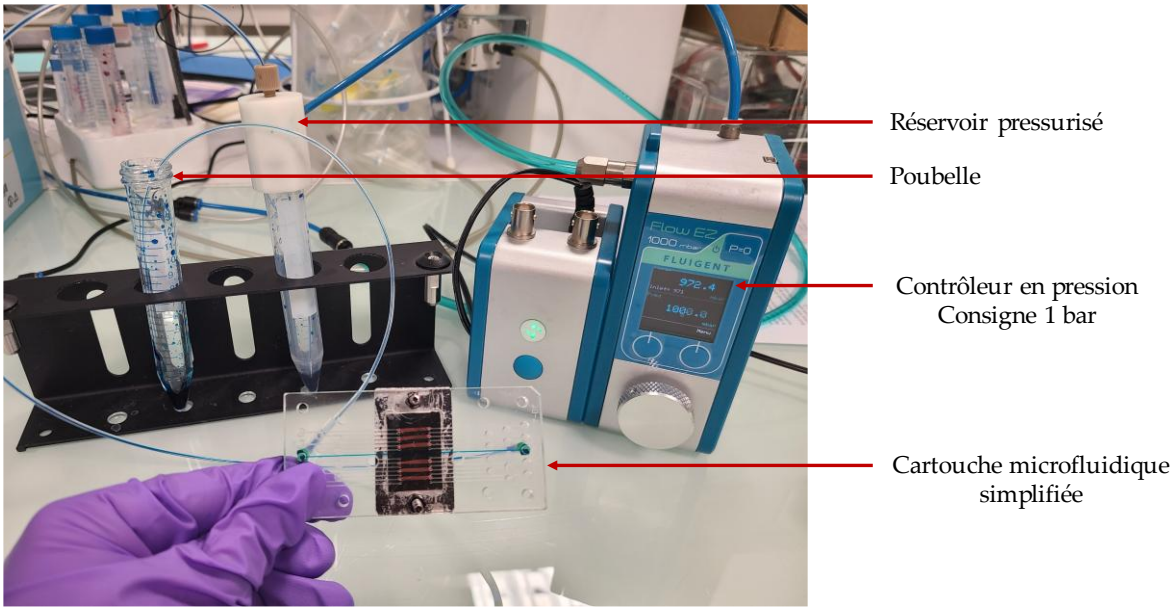


Figure A.5 : Montage fluidique avec le contrôleur de pression Flow EZ (Fluigent, France) et le réservoir pressurisé qui permettent de déplacer le fluidique dans la cartouche.

Annexe G

Architectures microfluidique avec leFlowStretch non retenues

La technologie FlowStretch a été choisie au départ pour développer un protocole de détection par fluorescence de cibles biologiques au moyen d'un biocapteur. Plusieurs essais d'architectures microfluidiques utilisant la technologie FlowStretch et intégrant le biocapteur de fluorescence sont présentés sur la Figure A.6. Ces premières ébauches d'architecture microfluidique, avec des chambres de volume calibré pour injecter les fluides, ont démontré la difficulté d'associer la microfluidique digitale avec ce projet de thèse. En effet, sur la Figure A.6-A la première idée était de positionner en amont et en aval des chambres calibrées pour injecter les fluides sur les zones de détection du biocapteur. Cependant l'architecture proposée est très encombrante avec des dimensions et des connexions pneumatiques impossibles à mettre en place avec ce format de cartouche. Même en réduisant le nombre de chambres comme pour la Figure A.6-B, cette méthode risquait de laisser trop de volume mort dans les chambres et les canaux et donc risquait d'amener des contaminations. Il aurait fallu faire de nombreux lavages, rendant le protocole fastidieux. De plus, ces chambres calibrées peuvent amener des bulles à l'intérieur du biocapteur, ce qui n'est pas idéal pour la stabilité et la reproductibilité des résultats quel que soit le type de biocapteur. Un autre inconvénient était qu'avec ce fonctionnement, le contrôle du débit n'est pas possible. Or nous souhaitions étudier l'influence de ce paramètre sur la biocapture et les performances du biocapteur. Utiliser la technologie FlowStretch avec sa méthode habituelle de contrôle des fluides est donc peu compatible avec le projet de thèse. C'est pourquoi, d'autres méthodes de contrôle de fluides ont été proposées tout en conservant le format des cartouches FlowStretch et l'actionnement pneumatique.

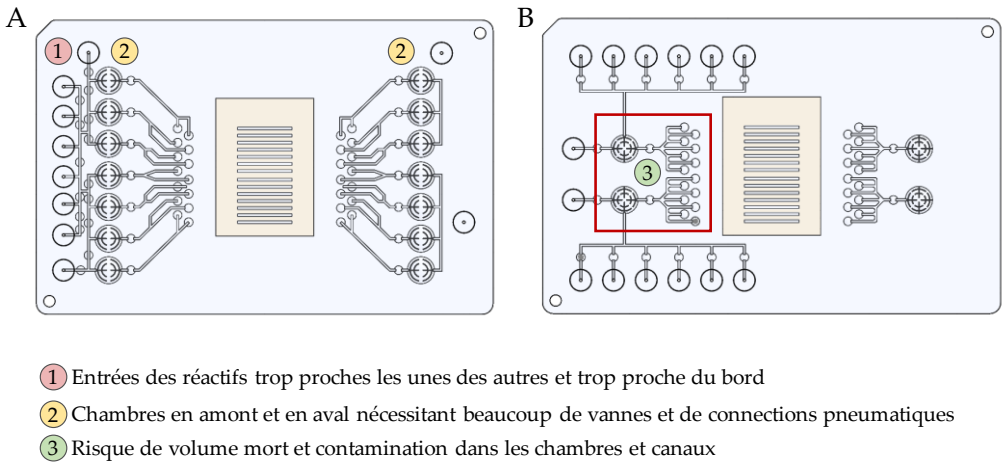


Figure A.6 : Premières architectures imaginées avec la technologie FlowStretch, A – Architecture avec plusieurs chambres en amont et en aval trop complexe à réaliser, B – Architecture avec moins de chambres mais avec un plus gros risque de contamination.

Annexe H

Caractérisation des micro-pompes à l'aide de billes fluorescentes

Pour caractériser les micro-pompes, un test préliminaire utilisant des microbilles de polystyrène fluorescentes d'1 µm de diamètre a été effectué. La Figure A.7 présente la mise en place du test avec l'injection de microbilles fluorescentes dans les canaux microfluidiques grâce à l'une des deux micro-pompes. Le débit est mesuré à partir du débitmètre positionné en sortie, avant la poubelle. Les vidéos sont acquises à l'aide du banc optique. Plusieurs tests ont été effectués, mais les microbilles sont trop rapides pour la caméra. Les analyses de tracking à l'aide du logiciel Fiji ou de programmes Python n'ont pas permis d'étudier les résultats à cause de cette vitesse. Pour réussir à discerner les microbilles pendant les phases d'expulsion du liquide, il faudrait utiliser une caméra rapide.

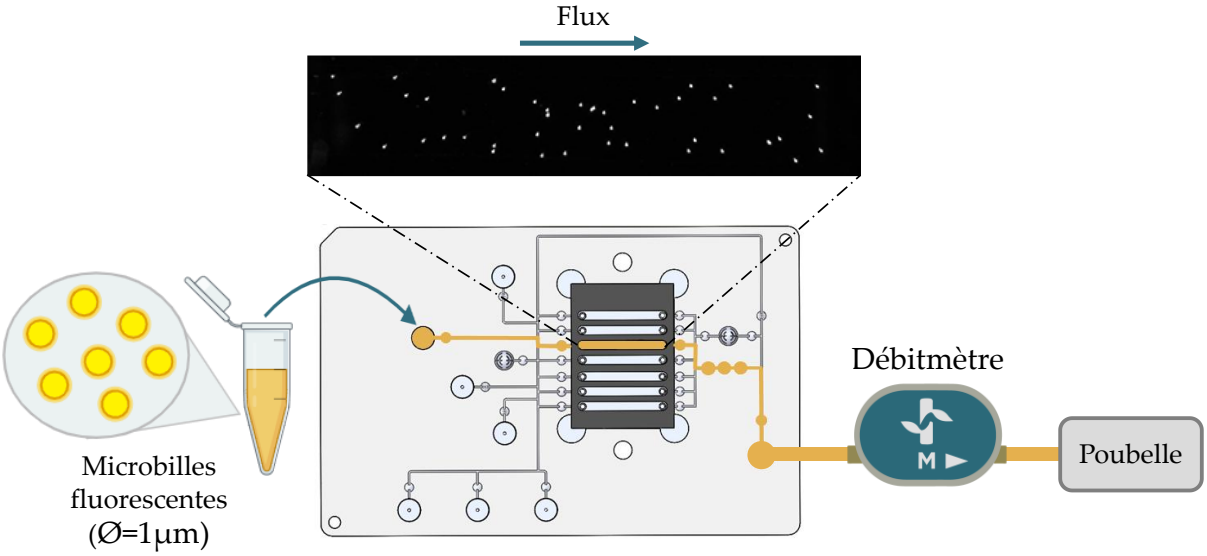


Figure A.7 : Principe schématisé de la caractérisation du débit des micro-pompes avec les microbilles fluorescentes.

Annexe I

Protocole d'immobilisation d'anticorps AF488 en condition statique

Cette Annexe présente le protocole d'immobilisation d'anticorps AF488 sur un biocapteur fonctionnalisé par voie gazeuse avec des anticorps lapin comme biorécepteurs, déposés à une concentration de 1 mg/mL. Le protocole consiste à déposer une goutte d'échantillon contenant les anticorps anti-lapin AF88 sur la zone de détection et à laisser l'ensemble incuber. Le protocole est le suivant (Figure A.8) :

- Dépôt d'une goutte de molécules cibles fluorescentes de 50 µl à une concentration de 100 µg/ml.
- Incubation d'une heure.
- Rinçage au PBS puis à l'eau distillée.
- Visualisation du résultat avec le banc optique.

Le biocapteur est analysé par le banc optique avec les paramètres suivants : la source lumineuse a été réglée à son maximum de puissance avec un ampérage à 1000 mA, de même pour le gain à 100 % et le temps d'intégration a été fixé à 750 ms. Cette configuration a permis de visualiser les plots fluorescents (Figure A.8) et par la suite de valider la compatibilité de la cartouche microfluidique avec le biocapteur.

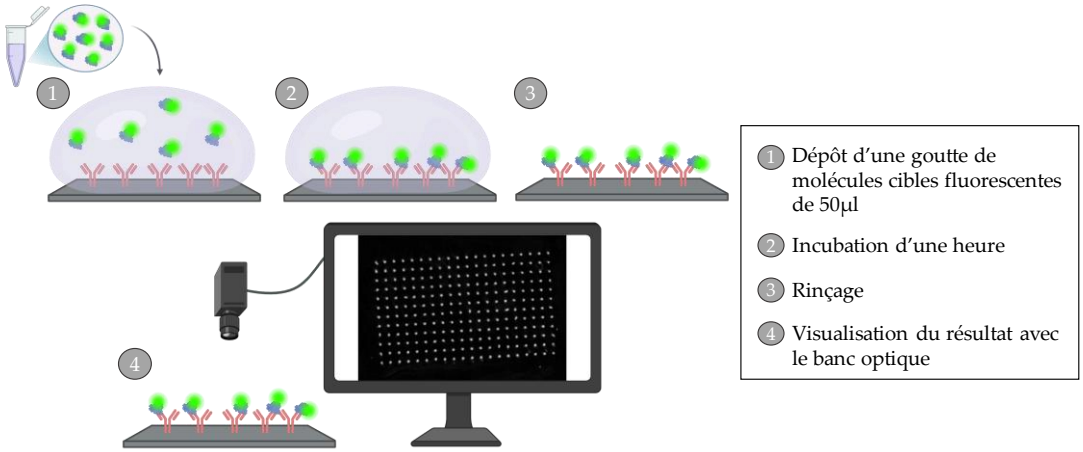


Figure A.8 : Protocole de biocapture par incubation statique et résultat de la visualisation des zones de fluorescence sans cartouche microfluidique avec les paramètres d'acquisition suivants : intensité de la LED à 1000 mA, gain à 100 % et gamma à 1.

Annexe J

Protocole fluidique pour purger la cartouche

La purge de l'air de la cartouche est réalisée en plusieurs étapes : la première consiste à préremplir le tube de sortie à l'aide d'une seringue. Les autres étapes réalisées dans la cartouche sont représentées sur la Figure IV.2 A.9 et sont effectuées avec une régulation en pression négative de - 400 mbar. Dans un premier temps, les canaux supérieurs et inférieurs correspondent aux canaux de purge, sont préremplis manuellement avec du PBS 1X (1). Puis c'est au tour des canaux centraux de détection, préremplis les uns après les autres (2). Si plusieurs entrées sont utilisées lors du protocole, celles-ci sont également purgées en passant par le canal inférieur (3). Une fois l'air chassé, le PBS 1X est retiré manuellement des réservoirs d'entrée pour ensuite mettre les échantillons.

	1	2	3					
v1	0	0	0	1	0	0	0	0
v2	1	1	1	0	0	0	0	0
v3	0	0	0	0	1	0	0	0
v4	0	0	0	0	0	1	0	0
v5	0	0	0	0	0	0	1	0
v10-16	0	0	1	0	0	0	0	0
v17	0	1	0	0	0	0	0	0
v18	0	0	1	0	0	0	0	0
v19	1	0	0	1	1	1	1	1

Etat vanne :

0	Fermée
1	Ouverte

v1-v5	Vanne connecté à un lueur d'entrée
v10-v16	Vanne connecté à un canal du capteur
v17-19	Vanne connectée à la sortie

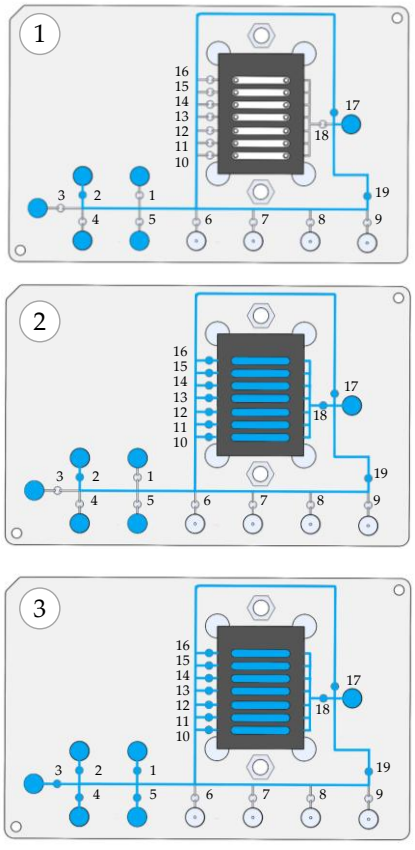


Figure A.9 : Séquences détaillées de l'actionnement des vannes pneumatiques, 1 – pré-remplissage des canaux extérieurs appelés canaux de purge via l'entrée n°2, 2- pré-remplissage des 7 canaux de détection, 3- purge de l'air dans les réservoirs d'entrée en passant par le canal de purge inférieur.

Annexe K

Code python pour le protocole de biodétection

Deux scripts python sont utilisés pour effectuer les protocoles de biodétection automatisés. Le script principal gère l'exécution séquentielle des étapes du protocole et le script secondaire regroupe les fonctions utilisées.

Script secondaire intégrant toutes les fonctions nécessaires au fonctionnement du code :

- Deux fonctions activation_poubelle et desactivation_poubelle qui permettent de contrôler l'ouverture ou la fermeture de la sortie avec la microvanne associée.

```
import sde
import time
import sys
import os
import pandas as pd

sys.path.append(os.path.dirname(os.getcwd()))  # pour chercher le dossier LSMB un cran plus haut

import lsmb.base.time as t


import lsmb.fluidic.pressure as p
import lsmb.fluidic.ev as ev
import lsmb.fluidic.camera as camera
import lsmb.fluidic.led as fluo

def activation_poubelle(poubelle):
    ev.set_evs(True,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("poubelle activée")


def desactivation_poubelle(poubelle):
    ev.set_evs(False,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("poubelle désactivée")
```

- La fonction saturation_BSA permet de réaliser le protocole de saturation à la BSA dans la cartouche

```
def saturation_BSA(entree,canal,poubelle,temps1,temps2):
    #on passe le tampon dans chaque canal un par un

    ev.set_evs(True,[entree], tempo=0,wait=t.wait)

    i=0
    #On ferme la vanne poubelle du capteur pour ouvrir celle a coté pour
remplir le canal supérieur
    ev.set_evs(False,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle[2]], tempo=0,wait=t.wait)
    time.sleep(temps1)
    ev.set_evs(False,[poubelle[2]], tempo=0,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle[3]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    time.sleep(temps1)
    ev.set_evs(False,[poubelle[3]], tempo=0.5,wait=t.wait)

    #canal 7

    while i < 3 :

        ev.set_evs(True,[canal[7]], tempo=0.5,wait=t.wait)
        print('on a ouvert le canal 7')
        ev.set_evs(True,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
        time.sleep(temps1)
        print('on remplis le canal pendant 2 min')
        # On fait une pause en fermant la vanne de la poubelle
        ev.set_evs(False,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
        print('on ferme la poubelle')
        time.sleep(temps2)
        print('on a fait une pause de 1 min')
        i=i+1

    ev.set_evs(False,[canal[7]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("on ferme le canal 7")

    i=0

    """
    même boucle while que le canal 7 pour tous les autres canaux
    """

    ev.set_evs(False,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[canal[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("on ferme le canal 1")
    ev.set_evs(False,[entree], tempo=0,wait=t.wait)
```

- La fonction lavage permet de nettoyer le canal sélectionné et la fonction injection permet d'injection le liquide d'une entrée dans un canal de détection.

```
def lavage(entree1, liste_canal, canal,temps_lavage,poubelle):

    print("lavage canal " + str(liste_canal.index(canal)) +" début")
    ev.set_evs(True,[entree1], tempo=0,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[canal], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    incubation(temps_lavage,f"lavage dans le canal n°
{liste_canal.index(canal)} pendant {temps_lavage / 60} minutes")
    ev.set_evs(False,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[entree1], tempo=0,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[canal], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("lavage canal "+ str(liste_canal.index(canal))+ " fin")


def injection(entree,liste_canal,canal,temps, poubelle):

    print("Injection canal "+ str(liste_canal.index(canal)) + " début")
    ev.set_evs(True,[entree], tempo=0,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[canal], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    incubation(temps,f"injection dans le canal n° {liste_canal.index(canal)}
pendant {temps / 60} minutes")
    ev.set_evs(False,[poubelle], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[entree], tempo=0,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[canal], tempo=0.5,wait=t.wait)
    print("Injection canal "+ str(liste_canal.index(canal)) + " fin")
```

- La fonction préremplissage est utilisée au début pour purger tous les canaux de la cartouche.

```
def preremplissage(entree,canal,poubelle, temps2):

    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl',
'Pressure', '-attr', 'Target for PNEGpoubelle', '-read_back', 'TRUE', '-
value', '-300' )


    #On remplie le canal supérieur avec le tampon
    ev.set_evs(True,[entree], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle[2]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    time.sleep(temps2)
    #On rempli le canal inférieur avec le tampon
    ev.set_evs(False,[poubelle[2]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle[3]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    time.sleep(temps2)
    ev.set_evs(False,[poubelle[3]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[entree], tempo=0,wait=t.wait)

    #on passe le tampon dans chaque canal un par un

    ev.set_evs(True,[entree], tempo=0.5,wait=t.wait)

    #canal 7
    ev.set_evs(True,[canal[7]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(True,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait) #on ouvre la
poubelle

    time.sleep(temps2)
    ev.set_evs(False,[poubelle[1]], tempo=0.5,wait=t.wait)
    ev.set_evs(False,[canal[7]], tempo=0.5,wait=t.wait)

    print("Préremplissage 7 finis")

  """
    même boucle while que le canal 7 pour tous les autres canaux
    """

    #femer entre PBS
    ev.set_evs(False,[entree], tempo=0.5,wait=t.wait)

    print("Préremplissage  finis")
```

- La fonction picture permet de prendre une image de fluorescence en allumant la LED avant la prise d'image, puis de l'éteindre après.

```
def picture(Name,temp_integ, current,DataFolder):


    #Camera parameters

    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_numerical_attribute', '-ctrl', 'LED
Driver', '-attr', 'LED 1 current', '-read_back', 'TRUE', '-value',
str(current) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl', 'Camera
attributes', '-attr', 'CAM1 Exposure Time', '-read_back', 'TRUE', '-value',
str(temp_integ) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_numerical_attribute', '-ctrl',
'Camera attributes', '-attr', 'CAM1 Master Gain', '-read_back', 'TRUE', '-
value', '100' )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl', 'Camera
attributes', '-attr', 'CAM1 Gamma', '-read_back', 'TRUE', '-value', '1' )


    time.sleep(5)

    #image storage
    TimeStamp2 = time.strftime("%Hh%Mmin%Ss")
    ImgFolder = DataFolder + 'images/'

    #ImgPath = ImgFolder + "IMG_" + Name + "__" + TimeStamp2

    ImgPath = ImgFolder + "__" + TimeStamp2 + "_IMG_" + Name

    #take picture

    fluo.set_on(1)  #allumer la led

    camera.capture(ImgPath,'CAM1')

    fluo.set_off(1) #éteindre la led

    print("Photo prise")


    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl', 'Camera
attributes', '-attr', 'CAM1 Exposure Time', '-read_back', 'TRUE', '-value',
'100' )
```

- La fonction pause permet d'arrêter le protocole entre deux actions. La fonction incubation fait apparaitre une fenêtre interactive pendant l'injection. Nous pouvons cliquer sur « arrêt » pour stopper l'injection de l'échantillon dans un canal de détection au cas où il y aurait un problème.

```
def PAUSE(message=''): # popup message OK / Cancel
    sde.execute_sde_command('pause','-message',message)


def incubation(T_incubation,titre):

    sde.execute_sde_command( "uflu_long_task_start", "-title", titre, "-
can_cancel", "true" )

    fin_incubation = time.time() + T_incubation
    tstart= time.time()
    while time.time() < fin_incubation:
        pourcentage = int(( time.time()-tstart)* 100 )/T_incubation)
        sde.execute_sde_command( "uflu_long_task_percentage", "-percentage",
str( pourcentage ) )

    sde.execute_sde_command( "uflu_long_task_stop" )
```

- La fonction ini_pressure permet de s'assurer que les pressions ont bien attent leur consigne avant d'injecter le liquide dans les canaux.

```
ef ini_pressure(Pvanne,Pchambre,PNEG_poubelle,PNEG_vanne):

    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl',
'Pressure', '-attr', 'Target for PNEGpoubelle', '-read_back', 'TRUE', '-
value', str(PNEG_poubelle) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl',
'Pressure', '-attr', 'Target for PNEGvanne', '-read_back', 'TRUE', '-value',
str(PNEG_vanne) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl',
'Pressure', '-attr', 'Target for PV', '-read_back', 'TRUE', '-value',
str(Pvanne) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_write_decimal_attribute', '-ctrl',
'Pressure', '-attr', 'Target for PC', '-read_back', 'TRUE', '-value',
str(Pchambre) )
    sde.execute_sde_command( 'uflu_run_action', '-ctrl', 'Pressure', '-
action', 'Regulate all by pressure' )
```

```
    try :
        p.wait_pressure(Pvanne, 'PV',ctrl='Pressure',connection=1, offset=10,
step=0.2)
        p.wait_pressure(Pchambre, 'PC',ctrl='Pressure',connection=1,
offset=10, step=0.2)
        p.wait_pressure(PNEG_poubelle,
'PNEGpoubelle',ctrl='Pressure',connection=1, offset=10, step=0.2)
        p.wait_pressure(PNEG_vanne, 'PNEGvanne',ctrl='Pressure',connection=1,
offset=10, step=0.2)

        print("OK pressure")

    except :
        PAUSE('probleme pression, verifier la pression et faire cancel')
```

Annexe L

Code python pour l'injection séquentielle du liquide dans les canaux

- Fonction ajoutée au script secondaire pour réaliser les injections séquentielles :

```
def injection_par_etape(entree, liste_canal, canal, titre,
poubelle,PNEG_debit, entree_PBS, temps_injections, temp_integ, current,
temps_lavage,DataFolder,Pvanne,PNEG_vanne,Pchambre,PNEG_poubelle_purge,poub
elle3):

    """
    Fonction pour effectuer une injection par étapes avec prise d'images
avant et après lavage.

    Args:
        entree: Source d'injection.
        liste_canal: Liste contenant les canaux disponibles.
        canal: Canal utilisé pour l'injection.
        titre: Titre associé aux images.
        poubelle: Activation ou désactivation de la poubelle.
        entree_PBS: Entrée pour le lavage PBS.
        entree_DIwater: Entrée pour le lavage à l'eau distillée.
        temps_injections: Dictionnaire des durées d'injection (clé : nom,
valeur : durée).
        temp_integ: Temps d'intégration pour la capture d'image.
        current: Courant utilisé pour la capture d'image.
        temps_lavage: Temps de lavage avec PBS.
        temps_lavage_eau: Temps de lavage avec eau distillée.

    Returns:
        None
    """

    # Générer les noms des images avant et après lavage
    noms_images_avant = [
        f'canal_{liste_canal.index(canal)}_{titre}_{nom}_avant_lavage'
        for nom in temps_injections.keys()
    ]

    noms_images_apres = [
        f'canal_{liste_canal.index(canal)}_{titre}_{nom}_apres_lavage'
        for nom in temps_injections.keys()
    ]

    j=1

    # Processus d'injection par étapes
```

```
    for i, (nom, temps_injection) in enumerate(temps_injections.items()):



        ini_pressure(Pvanne,Pchambre,PNEG_debit,PNEG_vanne)

        print("injection n°" + str(j) + " dans le canal " +
str(liste_canal.index(canal)))
        # Injection
        injection(entree, liste_canal, canal, temps_injection, poubelle)

        ev.set_evs(True,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(True,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait) #on ouvre la
poubelle

        # Capture d'image avant lavage
        picture(noms_images_avant[i]+str(temp_integ[3]), temp_integ[3],
current,DataFolder)

        ini_pressure(Pvanne,Pchambre,PNEG_poubelle_purge,PNEG_vanne)

        ev.set_evs(False,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(False,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)

        # Lavage avec PBS puis avec eau distillée
        lavage(entree_PBS,liste_canal, canal, temps_lavage, poubelle)

        # #on ouvre le pbs à -400mbar pendant les photos

        ev.set_evs(True,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(True,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait) #on ouvre la
poubelle

        # Capture d'image après lavage

        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[1]),
temp_integ[1], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[2]),
temp_integ[2], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[3]),
temp_integ[3], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[4]),
temp_integ[4], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[5]),
temp_integ[5], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[6]),
temp_integ[6], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[7]),
temp_integ[7], current,DataFolder)
```

```
        ev.set_evs(False,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(False,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)

        print("injection ac n°" + str(j) + " fini dans le canal " +
str(liste_canal.index(canal)))

        j=j+1
```

Annexe M

Code python pour le protocole de biodétection en sandwich

Fonction ajoutée au script secondaire pour réaliser le protocole de biodétection en sandwich :

```
def injection_par_etape_insuline(entree, liste_canal, canal, titre,
poubelle,PNEG_debit, entree_PBS, temps_injections, temp_integ, current,
temps_lavage,DataFolder,Pvanne,PNEG_vanne,Pchambre,PNEG_poubelle_purge,poubell
e3,entree_ac):

    """
    Fonction pour effectuer une injection par étapes avec prise d'images avant
et après lavage.

    Args:
        entree: Source d'injection.
        liste_canal: Liste contenant les canaux disponibles.
        canal: Canal utilisé pour l'injection.
        titre: Titre associé aux images.
        poubelle: Activation ou désactivation de la poubelle.
        entree_PBS: Entrée pour le lavage PBS.
        entree_DIwater: Entrée pour le lavage à l'eau distillée.
        temps_injections: Dictionnaire des durées d'injection (clé : nom,
valeur : durée).
        temp_integ: Temps d'intégration pour la capture d'image.
        current: Courant utilisé pour la capture d'image.
        temps_lavage: Temps de lavage avec PBS.
        temps_lavage_eau: Temps de lavage avec eau distillée.

    Returns:
        None
    """

    # Générer les noms des images avant et après lavage
    noms_images_avant = [
        f'canal_{liste_canal.index(canal)}_{titre}_{nom}_avant_lavage'
        for nom in temps_injections.keys()
    ]

    noms_images_apres = [
        f'canal_{liste_canal.index(canal)}_{titre}_{nom}_apres_lavage'
        for nom in temps_injections.keys()
    ]

    j=1
```

```
    # Processus d'injection par étapes
    for i, (nom, temps_injection) in enumerate(temps_injections.items()):



        ini_pressure(Pvanne,Pchambre,PNEG_debit,PNEG_vanne)

        print("injection n°" + str(j) + " dans le canal " +
str(liste_canal.index(canal)))
        # Injection insuline
        injection(entree, liste_canal, canal, temps_injection, poubelle)

        #incubation 1min

        time.sleep(60)

        # Capture d'image avant lavage
        picture(noms_images_avant[i]+str(temp_integ[3]), temp_integ[3],
current,DataFolder)

        ini_pressure(Pvanne,Pchambre,PNEG_poubelle_purge,PNEG_vanne)

        # Lavage avec PBS puis avec eau distillée
        lavage(entree_PBS,liste_canal, canal, temps_lavage, poubelle)

        #injection anticorps secondaire
        injection(entree_ac, liste_canal, canal, temps_injection, poubelle)

        #incubation 1min

        time.sleep(60)

        #Lavage avec PBS puis avec eau distillée
        lavage(entree_PBS,liste_canal, canal, temps_lavage, poubelle)

        #on ouvre le pbs à -400mbar pendant les photos

        ev.set_evs(True,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(True,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait) #on ouvre la
poubelle

        PAUSE('lavage canl 1 manuel')

        # Capture d'image après lavage

        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[1]),
temp_integ[1], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[2]),
temp_integ[2], current,DataFolder)
```

```
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[3]),
temp_integ[3], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[4]),
temp_integ[4], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[5]),
temp_integ[5], current,DataFolder)
        picture(noms_images_apres[i] + '_' + str(temp_integ[6]),
temp_integ[6], current,DataFolder)

        ev.set_evs(False,[poubelle3], tempo=0.5,wait=t.wait)
        ev.set_evs(False,[entree_PBS], tempo=0.5,wait=t.wait)

        print("injection ac n°" + str(j) + " fini dans le canal " +
str(liste_canal.index(canal)))

        j=j+1
```

Annexe N

Protocole de dissolution de l'insuline

Le protocole de biodétection a été réalisé avec une paire d'anticorps monoclonaux anti-insuline provenant de la souris (Medix Biochemica HM603 et HM604). Les anticorps HM604 ont été modifiés avec le kit de marquage fluorescent AF488 (Thermo Fischer). L'insuline en poudre a été achetée chez Merck (Insulin, Recombinant Human, Cat. No. 91077) et dissoute selon le protocole suivant :

- L'insuline est pesée selon la quantité souhaitée.
- L'insuline est dissoute dans de l'eau distillée.
- Le pH est ajusté aux alentours de 2,0 - 3,0 avec du HCl dilué (0,1 M) pour dissoudre totalement l'insuline dans la solution.
- La solution est filtrée avec un filtre de taille 0,2 μm.

Annexe O

Protocole d'immobilisation d'azoture marqué à l'AlexaFluor647

Le protocole effectué pour la caractérisation de la chimie click réalisé à l'aide d'un azoture marqué à l'AlexaFluor 647 nm (AF-N_3, Thermo Fisher) est présenté dans cette Annexe :

Deux solutions d'AF-N_3 dans du Tris 1X ont été préparées pour obtenir des concentrations de 2,94 μM et 5,88 μM. Trois substrats ont été analysés : un témoin négatif non fonctionnalisé, un substrat silanisé avec un ratio 1 :2 (Silane-PEG3400-DBCO/silane-PEG-OH) et un substrat silanisé avec un ratio 1 :4 (Silane-PEG3400-DBCO/silane-PEG-OH). Sur chaque substrat, un volume de 0,5 μl d'AF-N_3 a été déposé pour chaque concentration (en duplicat). Une incubation de 2 h a ensuite été effectuée dans le noir. Les substrats ont ensuite été rincés dans un bain d'eau déionisée, 3 x 5 min, sous agitation puis séchés à l'azote. Les substrats ont ensuite été analysés avec un scanner.

Des données ont été traitées en retirant le bruit de fond local moyen pour chaque plot avec la méthode présentée sur la Figure A.10.

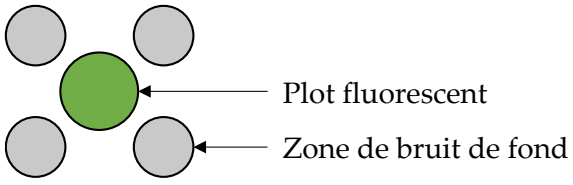


Figure A.10 : Bruit de fond moyen soustrait à l'intensité de fluorescence du plot.

Annexe P

Protocole pour la caractérisation de la réactivité biologique en condition statique

Pour ces tests, des anticorps lapin modifiés avec un groupement azoture (C= 1 mg/ml) ont été fonctionnalisés sur la surface de nos biocapteurs d'après les protocoles présentés dans le chapitre II. Quatre concentrations (10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml) d'anticorps anti-lapin AF488 dans une solution de PBS 1X ont ensuite été déposées sur la surface des biocapteurs à partir du protocole suivant :

- Dépôt d'une goutte de molécules cibles fluorescentes de 50 µl à une concentration de 100 µg/ml.
- Incubation d'une heure.
- Rinçage au PBS puis à l'eau distillée.
- Visualisation du résultat au scanner.

Plan de dépôt :

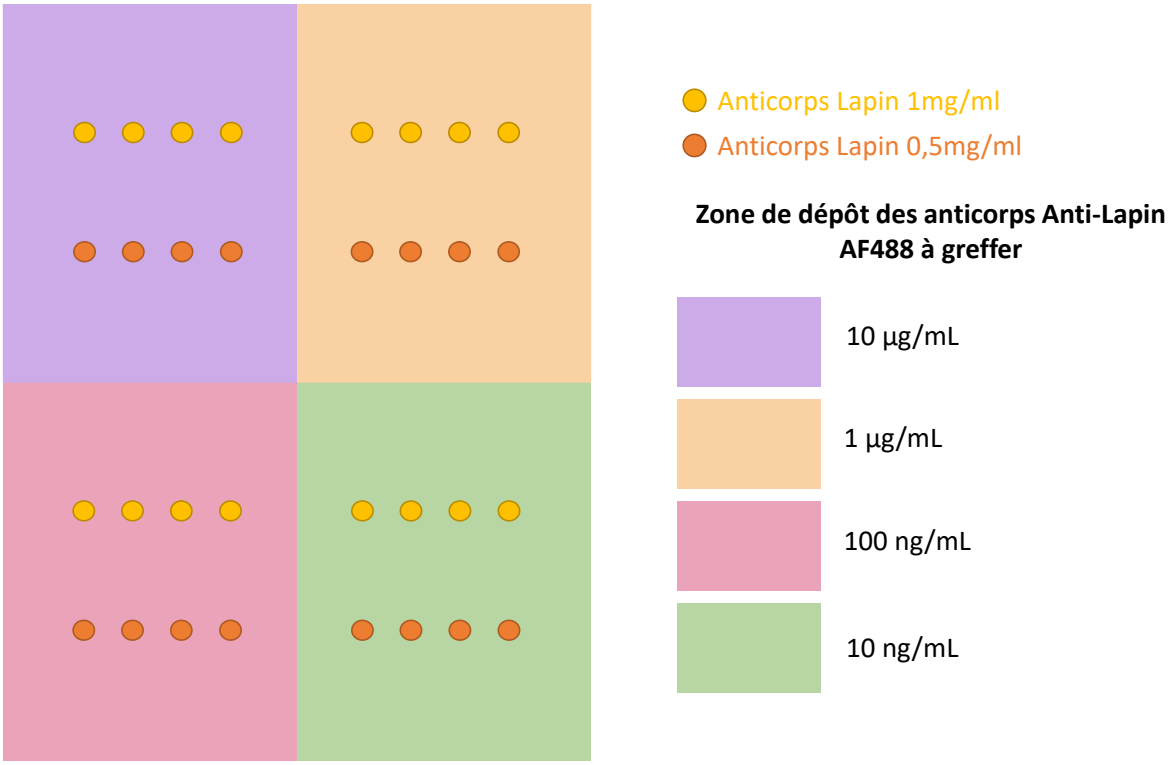


Figure A.11 : Plan de dépôt des anticorps lapins à une concentration de 0,5 mg/mL et 1 mg/mL.

Des données ont été traitées en retirant le bruit de fond local moyen pour chaque plot avec la méthode présentée sur LA Figure A.10 de l'annexe O.

Bibliographie

[1] D. Sun, W. Gao, H. Hu, and S. Zhou, "Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 12, no. 7, pp. 3049–3062, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.apsb.2022.02.002.

[2] S. D., M. N., A. Pise, S. Pise, and L. Vs, "Ban of Cosmetic Testing on Animals: A Brief Overview," *IJCRR*, vol. 12, no. 14, pp. 113–116, 2020, doi: 10.31782/IJCRR.2020.121424.

[3] Y. Liu, H. Xu, S. Abraham, X. Wang, and B. D. Keavney, "Progress of 3D Organoid Technology for Preclinical Investigations: Towards Human In Vitro Models," *IJDDP*, p. 9, Dec. 2022, doi: 10.53941/ijddp.v1i1.188.

[4] C. Yun *et al.*, "Advantages of Using 3D Spheroid Culture Systems in Toxicological and Pharmacological Assessment for Osteogenesis Research," *IJMS*, vol. 25, no. 5, p. 2512, Feb. 2024, doi: 10.3390/ijms25052512.

[5] Y. M. Efremov *et al.*, "Mechanical properties of cell sheets and spheroids: the link between single cells and complex tissues," *Biophys Rev*, vol. 13, no. 4, pp. 541–561, Aug. 2021, doi: 10.1007/s12551-021-00821-w.

[6] T. Rodrigues *et al.*, "Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 184, pp. 201–211, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.018.

[7] Z. Živković and T. Opačak-Bernardi, "An Overview on Spheroid and Organoid Models in Applied Studies," *Sci*, vol. 7, no. 1, p. 27, Mar. 2025, doi: 10.3390/sci7010027.

[8] V. Foglizzo, E. Cocco, and S. Marchiò, "Advanced Cellular Models for Preclinical Drug Testing: From 2D Cultures to Organ-on-a-Chip Technology," *Cancers*, vol. 14, no. 15, p. 3692, Jul. 2022, doi: 10.3390/cancers14153692.

[9] K. Mizoi, H. Arakawa, K. Yano, S. Koyama, H. Kojima, and T. Ogihara, "Utility of Three-Dimensional Cultures of Primary Human Hepatocytes (Spheroids) as Pharmacokinetic Models," *Biomedicines*, vol. 8, no. 10, p. 374, Sep. 2020, doi: 10.3390/biomedicines8100374.

[10] M. E. Sakalem, M. T. De Sibio, F. A. da S. da Costa, and M. de Oliveira, "Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine," *Biotechnology Journal*, vol. 16, no. 5, p. 2000463, May 2021, doi: 10.1002/biot.202000463.

[11] J. Shoji, R. P. Davis, C. L. Mummery, and S. Krauss, "Global Literature Analysis of Organoid and Organ-on-Chip Research," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 13, no. 21, p. 2301067, 2024, doi: 10.1002/adhm.202301067.

[12] B. Ahammed and S. K. Kalangi, "A Decade of Organoid Research: Progress and Challenges in the Field of Organoid Technology," *ACS Omega*, vol. 9, no. 28, pp. 30087–30096, Jul. 2024, doi: 10.1021/acsomega.4c03683.

[13] K. Y. Makesh *et al.*, "A Concise Review of Organoid Tissue Engineering: Regenerative Applications and Precision Medicine," *Organoids*, vol. 4, no. 3, p. 16, Jul. 2025, doi: 10.3390/organoids4030016.

[14] Z. Gilazieva, A. Ponomarev, C. Rutland, A. Rizvanov, and V. Solovyeva, "Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine," *Cancers*, vol. 12, no. 10, p. 2727, Sep. 2020, doi: 10.3390/cancers12102727.

[15] J. H. Heo, D. Kang, S. J. Seo, and Y. Jin, "Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture".

[16] T. Chauhdari, S. A. Zaidi, J. Su, and Y. Ding, "Organoids meet microfluidics: recent advancements, challenges, and future of organoids-on-chip," *In vitro models*, vol. 4, no. 1, pp. 71–88, Mar. 2025, doi: 10.1007/s44164-025-00086-7.

[17] K. Białkowska, P. Komorowski, M. Bryszewska, and K. Miłowska, "Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application," *IJMS*, vol. 21, no. 17, p. 6225, Aug. 2020, doi: 10.3390/ijms21176225.

[18] L. Papamichail, L. S. Koch, D. Veerman, K. Broersen, and A. D. Van Der Meer, "Organoids-on-a-chip: microfluidic technology enables culture of organoids with enhanced tissue function and potential for disease modeling," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 13, p. 1515340, Mar. 2025, doi: 10.3389/fbioe.2025.1515340.

[19] G. Fang, Y. Chen, H. Lu, and D. Jin, "Advances in Spheroids and Organoids on a Chip," *Adv Funct Materials*, vol. 33, no. 19, p. 2215043, May 2023, doi: 10.1002/adfm.202215043.

[20] S. E. Park, A. Georgescu, and D. Huh, "Organoids-on-a-chip," 2019.

[21] F. Yu, W. Hunziker, and D. Choudhury, "Engineering Microfluidic Organoid-on-a-Chip Platforms," *Micromachines*, vol. 10, no. 3, p. 165, Feb. 2019, doi: 10.3390/mi10030165.

[22] N. Convery and N. Gadegaard, "30 years of microfluidics," *Micro and Nano Engineering*, vol. 2, pp. 76–91, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.

[23] C. J. Taylor, J. A. Manson, G. Clemens, B. A. Taylor, T. W. Chamberlain, and R. A. Bourne, "Modern advancements in continuous-flow aided kinetic analysis," *React. Chem. Eng.*, vol. 7, no. 5, pp. 1037–1046, 2022, doi: 10.1039/D1RE00467K.

[24] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, and D. J. Beebe, "The present and future role of microfluidics in biomedical research," *Nature*, vol. 507, no. 7491, pp. 181–189, Mar. 2014, doi: 10.1038/nature13118.

[25] S. M. Saravanakumar and P.-V. Cicek, "Microfluidic Mixing: A Physics-Oriented Review," 2023.

[26] W. D. Wong, "Enhancement of mixing and reaction efficiency of various fluids applications at different microfluidic configuration and design," *Chemical Engineering and Processing*, 2024.

[27] Z. Chen, S. Kheiri, E. W. K. Young, and E. Kumacheva, "Trends in Droplet Microfluidics: From Droplet Generation to Biomedical Applications," *Langmuir*, vol. 38, no. 20, pp. 6233–6248, May 2022, doi: 10.1021/acs.langmuir.2c00491.

[28] W. Han and X. Chen, "A review on microdroplet generation in microfluidics," *J Braz. Soc. Mech. Sci. Eng.*, vol. 43, no. 5, p. 247, May 2021, doi: 10.1007/s40430-021-02971-0.

[29] H. Cha *et al.*, "Multiphysics microfluidics for cell manipulation and separation: a review," *Lab Chip*, vol. 22, no. 3, pp. 423–444, 2022, doi: 10.1039/D1LC00869B.

[30] S. Wang, Q. Xu, Y. Cai, Q. Wang, Y. Liu, and D. Wang, "Biological particle separation techniques based on microfluidics," *Interdisciplinary Medicine*, vol. 2, no. 2, p. e20240003, Apr. 2024, doi: 10.1002/INMD.20240003.

[31] R. Pol, F. Céspedes, D. Gabriel, and M. Baeza, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms for environmental monitoring," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 95, pp. 62–68, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.08.00

[32] B. A. AlMashrea, A. M. Almehdi, and S. Damiati, "Simple microfluidic devices for in situ detection of water contamination: a state-of-art review," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 12, p. 1355768, Feb. 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1355768.

[33] P.-L. Lonchamps, Y. He, K. Wang, and X. Lu, "Detection of pathogens in foods using microfluidic 'lab-on-chip': A mini review," *Journal of Agriculture and Food Research*, vol. 10, p. 100430, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.jafr.2022.100430.

[34] S. M. Rafiq *et al.*, "Lab-on-a-chip device for food quality control and safety," *Food Control*, vol. 164, p. 110596, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.foodcont.2024.110596.

[35] T. Lehnert and M. A. M. Gijs, "Microfluidic systems for infectious disease diagnostics," *Lab Chip*, vol. 24, no. 5, pp. 1441–1493, 2024, doi: 10.1039/D4LC00117F.

[36] Z. Liu *et al.*, "Microfluidic biosensors for biomarker detection in body fluids: a key approach for early cancer diagnosis," *Biomark Res*, vol. 12, no. 1, p. 153, Dec. 2024, doi: 10.1186/s40364-024-00697-4.

[37] A. Bhusal, S. Yogeshwaran, H. Goodarzi Hosseinabadi, B. Cecen, and A. K. Miri, "Microfluidics for High Throughput Screening of Biological Agents and Therapeutics," *Biomedical Materials & Devices*, vol. 3, no. 1, pp. 93–107, Mar. 2025, doi: 10.1007/s44174-024-00169-1.

[38] A. Tajeddin and N. Mustafaoglu, "Design and Fabrication of Organ-on-Chips: Promises and Challenges," *Micromachines*, vol. 12, no. 12, p. 1443, Nov. 2021, doi: 10.3390/mi12121443.

[39] V. Narayanamurthy *et al.*, "Advances in passively driven microfluidics and lab-on-chip devices: a comprehensive literature review and patent analysis," *RSC Adv.*, vol. 10, no. 20, pp. 11652–11680, 2020, doi: 10.1039/D0RA00263A.

[40] Z. Li, B. Zhang, D. Dang, X. Yang, W. Yang, and W. Liang, "A review of microfluidic-based mixing methods," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 344, p. 113757, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.sna.2022.113757.

[41] A. P. Iakovlev, A. S. Erofeev, and P. V. Gorelkin, "Novel Pumping Methods for Microfluidic Devices: A Comprehensive Review," *Biosensors*, vol. 12, no. 11, p. 956, Nov. 2022, doi: 10.3390/bios12110956.

[42] A. Alizadeh, W. Hsu, M. Wang, and H. Daiguji, "Electroosmotic flow: From microfluidics to nanofluidics," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 7–8, pp. 834–868, Apr. 2021, doi: 10.1002/elps.202000313.

[43] L. Li, X. Wang, Q. Pu, and S. Liu, "Advancement of electroosmotic pump in microflow analysis: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1060, pp. 1–16, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.02.004.

[44] J. Rufo, F. Cai, J. Friend, M. Wiklund, and T. J. Huang, "Acoustofluidics for biomedical applications," *Nat Rev Methods Primers*, vol. 2, no. 1, p. 30, Apr. 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00109-7.

[45] H. Yuan *et al.*, "Recent advances in centrifugal microfluidics for point-of-care testing," *Lab Chip*, vol. 25, no. 5, pp. 1015–1046, 2025, doi: 10.1039/D4LC00779D.

[46] S. J. Bae, S. J. Lee, J. U. Heo, and D. J. Im, "Syringe pump-embedded, on-demand sample supply and collection system for droplet 3D cell culture in digital microfluidics," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 419, p. 136439, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.snb.2024.136439.

[47] A. Mudugamuwa *et al.*, "Periodic Flows in Microfluidics," *Small*, vol. 20, no. 50, p. 2404685, Dec. 2024, doi: 10.1002/smll.202404685.

[48] Y. Zheng *et al.*, "Micropumps and microvalves for biomedical applications," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 188, p. 118236, Jul. 2025, doi: 10.1016/j.trac.2025.118236.

[49] J.-Y. Qian, C.-W. Hou, X.-J. Li, and Z.-J. Jin, "Actuation Mechanism of Microvalves: A Review," *Micromachines*, vol. 11, no. 2, p. 172, Feb. 2020, doi: 10.3390/mi11020172.

[50] G. Singh *et al.*, "Advancement of organ-on-chip towards next generation medical technology," *Biosensors and Bioelectronics: X*, vol. 18, p. 100480, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.biosx.2024.100480.

[51] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow," *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2165–2174, 2012, doi: 10.1039/C2LC40074J.

[52] K. H. Benam *et al.*, "Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro.," *Nat Methods*, vol. 13, no. 2, pp. 151–157, Feb. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3697.

[53] T.-E. Park *et al.*, "Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 2621, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10588-0.

[54] C. Beaurivage, A. Kanapeckaite, C. Loomans, K. S. Erdmann, J. Stallen, and R. A. J. Janssen, "Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflammatory processes," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 21475, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-78359-2.

[55] K. Kim *et al.*, "Three-Dimensional Kidney-on-a-Chip Assessment of Contrast-Induced Kidney Injury: Osmolality and Viscosity," *Micromachines*, vol. 13, no. 5, p. 688, Apr. 2022, doi: 10.3390/mi13050688.

[56] M. Nikolaev *et al.*, "Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis," *Nature*, vol. 585, no. 7826, pp. 574–578, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2724-8.

[57] E.-K. Min *et al.*, "Advanced Lung-on-a-Chip Technology: Mimicking the Complex Human Lung Microenvironment," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 17–39, Jan. 2025, doi: 10.7150/ijbs.105702.

[58] S. T. Seiler *et al.*, "Modular automated microfluidic cell culture platform reduces glycolytic stress in cerebral cortex organoids," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 20173, Nov. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-20096-9.

[59] B.-J. Jin *et al.*, "Microfluidics platform for measurement of volume changes in immobilized intestinal enteroids," *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 2, p. 024106, Mar. 2014, doi: 10.1063/1.4870400.

[60] G. Fang *et al.*, "Enabling peristalsis of human colon tumor organoids on microfluidic chips," *Biofabrication*, vol. 14, no. 1, p. 015006, Jan. 2022, doi: 10.1088/1758-5090/ac2ef9.

[61] C. Quintard *et al.*, "A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip," *Nat Commun*, vol. 15, no. 1, p. 1452, Feb. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-45710-4.

[62] K. Kaarj and J.-Y. Yoon, "Methods of Delivering Mechanical Stimuli to Organ-on-a-Chip," *Micromachines*, vol. 10, no. 10, p. 700, Oct. 2019, doi: 10.3390/mi10100700.

[63] C. L. Thompson, S. Fu, H. K. Heywood, M. M. Knight, and S. D. Thorpe, "Mechanical Stimulation: A Crucial Element of Organ-on-Chip Models," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 602646, Dec. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.602646.

[64] S.-H. Park, W. Y. Sim, B.-H. Min, S. S. Yang, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, "Chip-Based Comparison of the Osteogenesis of Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells under Mechanical Stimulation," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, p. e46689, Sep. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046689.

[65] R. A. Lima, "The Impact of Polydimethylsiloxane (PDMS) in Engineering: Recent Advances and Applications," *Fluids*, vol. 10, no. 2, p. 41, Feb. 2025, doi: 10.3390/fluids10020041.

[66] K. Grindulis, N. G. Matusevica, V. Kozlova, R. Rimsa, K. Klavins, and G. Mozolevskis, "Sorption and release of small molecules in PDMS and COC for Organs on chip," *Sci Rep*, vol. 15, no. 1, p. 14012, Apr. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-97111-2.

[67] R. Filion *et al.*, "Mass fabrication of PDMS microfluidic devices by injection molding and applications in sensitive 3D spheroid and explant culture," *Sci Rep*, vol. 15, no. 1, p. 33218, Sep. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-16863-z.

[68] European Commission. Joint Research Centre., *Organ on chip: building a roadmap towards standardisation : putting science into standards.* LU: Publications Office, 2021. Accessed: Oct. 07, 2025. [Online]. Available: https://data.europa.eu/doi/10.2760/819439

[69] J. Sabaté del Río, J. Ro, H. Yoon, T.-E. Park, and Y.-K. Cho, "Integrated technologies for continuous monitoring of organs-on-chips: Current challenges and potential solutions," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 224, p. 115057, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.bios.2022.115057.

[70] E. Ferrari, C. Palma, S. Vesentini, P. Occhetta, and M. Rasponi, "Integrating Biosensors in Organs-on-Chip Devices: A Perspective on Current Strategies to Monitor Microphysiological Systems," *Biosensors*, vol. 10, no. 9, Art. no. 9, Sep. 2020, doi: 10.3390/bios10090110.

[71] H.-C. Hsieh *et al.*, "Imaging 3D cell cultures with optical microscopy," *Nat Methods*, vol. 22, no. 6, pp. 1167–1190, Jun. 2025, doi: 10.1038/s41592-025-02647-w.

[72] K. Fei, J. Zhang, J. Yuan, and P. Xiao, "Present Application and Perspectives of Organoid Imaging Technology," *Bioengineering*, vol. 9, no. 3, p. 121, Mar. 2022, doi: 10.3390/bioengineering9030121.

[73] S. Fuchs, S. Johansson, A. Ø. Tjell, G. Werr, T. Mayr, and M. Tenje, "In-Line Analysis of Organ-on-Chip Systems with Sensors: Integration, Fabrication, Challenges, and Potential," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, no. 7, pp. 2926–2948, Jul. 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01110.

[74] P. L. M. Lee, "DNA amplification in the field: move over PCR , here comes LAMP," *Molecular Ecology Resources*, vol. 17, no. 2, pp. 138–141, Mar. 2017, doi: 10.1111/1755-0998.12548.

[75] M. Abbasi *et al.*, "Evaluation of Apoptosis-Related Genes and Hormone Secretion Profiles Using Three Dimensional Culture System of Human Testicular Organoids:," *GMJ*, vol. 12, Aug. 2023, doi: 10.31661/gmj.v12i.2805.

[76] Surina *et al.*, "Patient-derived spheroids and patient-derived organoids simulate evolutions of lung cancer," *Heliyon*, vol. 9, no. 3, p. e13829, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13829.

[77] M. Khan, S. H. Shah, M. Salman, M. Abdullah, F. Hayat, and S. Akbar, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A General Overview," *GJMPBU*, vol. 18, p. 1, Feb. 2023, doi: 10.25259/GJMPBU_77_2022.

[78] W. Yang, T. Li, S. Liao, J. Zhou, and L. Huang, "Organ-on-a-chip platforms integrated with biosensors for precise monitoring of the cells and cellular microenvironment," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 172, p. 117569, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.trac.2024.117569.

[79] P. M. Misun, J. Rothe, Y. R. F. Schmid, A. Hierlemann, and O. Frey, "Multi-analyte biosensor interface for real-time monitoring of 3D microtissue spheroids in hanging-drop networks," *Microsyst Nanoeng*, vol. 2, no. 1, p. 16022, Dec. 2016, doi: 10.1038/micronano.2016.22.

[80] N. Li, Y. Jiang, T. Lv, G. Li, and F. Yang, "Immunofluorescence analysis of breast cancer biomarkers using antibody-conjugated microbeads embedded in a microfluidic-based liquid biopsy chip," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 216, p. 114598, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.bios.2022.114598.

[81] H. Wang *et al.*, "A microfluidic indirect competitive immunoassay for multiple and sensitive detection of testosterone in serum and urine," *Analyst*, vol. 141, no. 3, pp. 815–819, 2016, doi: 10.1039/C5AN01835H.

[82] P. G. M. Condelipes *et al.*, "Microfluidic capillary platform with hydrophilic PDMS for point-of-care immunoassays," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 423, p. 136831, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.snb.2024.136831.

[83] J. Park, V. Sunkara, T.-H. Kim, H. Hwang, and Y.-K. Cho, "Lab-on-a-Disc for Fully Integrated Multiplex Immunoassays," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 5, pp. 2133–2140, Mar. 2012, doi: 10.1021/ac203163u.

[84] R. Derakhshan, A. Ramiar, A. Ghasemi, and A. Mostafazadeh, "Fully automated and integrated centrifugal microfluidic device for high-performance prostate-specific antigen immunoassay," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 443, p. 138237, Nov. 2025, doi: 10.1016/j.snb.2025.138237.

[85] G. Choi, B. B. Mangadu, Y. K. Light, and R. J. Meagher, "Portable microfluidic immunoassay platform for the detection of inflammatory protein biomarkers," *Sens. Diagn.*, vol. 3, no. 4, pp. 648–658, 2024, doi: 10.1039/D3SD00258F.

[86] S. Wang, B. Li, D. McLeod, and Z. Li, "A handheld plug-and-play microfluidic liquid handling automation platform for immunoassays," *HardwareX*, vol. 14, p. e00420, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.ohx.2023.e00420.

[87] C. Parent *et al.*, "A versatile and automated microfluidic platform for a quantitative magnetic bead based protocol: application to gluten detection," *Lab Chip*, vol. 22, no. 17, pp. 3147–3156, 2022, doi: 10.1039/D2LC00328G.

[88] J. Kim, J. Kim, Y. Jin, and S.-W. Cho, "In situ biosensing technologies for an organ-on-a-chip," *Biofabrication*, vol. 15, no. 4, p. 042002, Oct. 2023, doi: 10.1088/1758-5090/aceaae.

[89] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications – A review," *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.

[90] L. C. Clark and C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, Oct. 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.

[91] A. Singh *et al.*, "Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope," *Biosensors*, vol. 11, no. 9, p. 336, Sep. 2021, doi: 10.3390/bios11090336.

[92] N. Sagar Shrikrishna, R. Sharma, J. Sahoo, A. Kaushik, and S. Gandhi, "Navigating the landscape of optical biosensors," *Chemical Engineering Journal*, vol. 490, p. 151661, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.151661.

[93] P. Skládal, "Piezoelectric biosensors: shedding light on principles and applications," *Microchim Acta*, vol. 191, no. 4, p. 184, Apr. 2024, doi: 10.1007/s00604-024-06257-9.

[94] M. Yakovleva, S. Bhand, and B. Danielsson, "The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 766, pp. 1–12, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.004.

[95] M. P. Nair, A. J. T. Teo, and K. H. H. Li, "Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications," *Micromachines*, vol. 13, no. 1, p. 24, Dec. 2021, doi: 10.3390/mi13010024.

[96] X. Fang, Y. Zheng, Y. Duan, Y. Liu, and W. Zhong, "Recent Advances in Design of Fluorescence-Based Assays for High-Throughput Screening," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 1, pp. 482–504, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b05303.

[97] Q. Avenas, "Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique".

[98] N. Gaignebet, "Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques: Vers un dispositif de biodétection intégré," p. 178.

[99] B. Spackova, P. Wrobel, M. Bockova, and J. Homola, "Optical Biosensors Based on Plasmonic Nanostructures: A Review," *Proc. IEEE*, vol. 104, no. 12, pp. 2380–2408, Dec. 2016, doi: 10.1109/JPROC.2016.2624340.

[100] S. Scarano, C. Scuffi, M. Mascini, and M. Minunni, "Surface plasmon resonance imaging (SPRi)-based sensing: A new approach in signal sampling and management," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 4, pp. 1380–1385, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.07.056.

[101] A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne, "Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 7, pp. 2264–2271, Feb. 2005, doi: 10.1021/ja044087q.

[102] S. Barthelme, F. Chatelain, C. Cascales, and C. Herrier, "Correction de dérive pour l'interférométrie de Mach-Zehnder," in *GRETSI 2022 - XXVIIIème Colloque Francophone de Traitement du Signal et des Images*, Nancy, France, Sep. 2022. Accessed: Aug. 21, 2023. [Online]. Available: https://hal.science/hal-03738571

[103] V. Fallahi, Z. Kordrostami, and M. Hosseini, "Sensitivity and quality factor improvement of photonic crystal sensors by geometrical optimization of waveguides and micro-ring resonators combination," *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 2001, Jan. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-52363-2.

[104] H. Wang *et al.*, "Optofluidic chip with directly printed polymer optical waveguide Mach-Zehnder interferometer sensors for label-free biodetection," *Biomed. Opt. Express*, vol. 15, no. 5, p. 3240, May 2024, doi: 10.1364/BOE.523055.

[105] M. R. Lee and P. M. Fauchet, "Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection," *Opt. Express*, vol. 15, no. 8, p. 4530, 2007, doi: 10.1364/OE.15.004530.

[106] M. A. Butt, B. Imran Akca, and X. Mateos, "Integrated Photonic Biosensors: Enabling Next-Generation Lab-on-a-Chip Platforms," *Nanomaterials*, vol. 15, no. 10, p. 731, May 2025, doi: 10.3390/nano15100731.

[107] W. Cheng, S. Ye, B. Yuan, J. H. Marsh, and L. Hou, "Subwavelength Grating Cascaded Microring Resonator Biochemical Sensors with Record-High Sensitivity," *ACS Photonics*, vol. 11, no. 8, pp. 3343–3350, Aug. 2024, doi: 10.1021/acsphotonics.4c00778.

[108] L. S. Puumala *et al.*, "Biofunctionalization of Multiplexed Silicon Photonic Biosensors," *Biosensors*, vol. 13, no. 1, p. 53, Dec. 2022, doi: 10.3390/bios13010053.

[109] A. Herrmann, R. Haag, and U. Schedler, "Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications," *Adv Healthcare Materials*, vol. 10, no. 11, p. 2100062, Jun. 2021, doi: 10.1002/adhm.202100062.

[110] Y. Zhang, M. Ma, H. A. Aisa, and L. Chen, "Oriented Immobilization of IgG for Immunosensor Development," *Chemosensors*, vol. 13, no. 2, p. 50, Feb. 2025, doi: 10.3390/chemosensors13020050.

[111] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021, 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

[112] S. Geidel *et al.*, "Integration of an Optical Ring Resonator Biosensor into a Self-Contained Microfluidic Cartridge with Active, Single-Shot Micropumps," *Micromachines*, vol. 7, no. 9, p. 153, Sep. 2016, doi: 10.3390/mi7090153.

[113] S. Lehmann, F. A. Kraft, and M. Gerken, "Spatially Resolved Protein Binding Kinetics Analysis in Microfluidic Photonic Crystal Sensors," *Sensors*, vol. 23, no. 12, p. 5637, Jun. 2023, doi: 10.3390/s23125637.

[114] G. Saorin, I. Caligiuri, and F. Rizzolio, "Microfluidic organoids-on-a-chip: The future of human models," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 144, pp. 41–54, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.semcdb.2022.10.001.

[115] Z. Rezaei *et al.*, "Enhancing organoid technology with carbon-based nanomaterial biosensors: Advancements, challenges, and future directions," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 222, p. 115592, Jul. 2025, doi: 10.1016/j.addr.2025.115592.

[116] V. Velasco, S. A. Shariati, and R. Esfandyarpour, "Microtechnology-based methods for organoid models," *Microsyst Nanoeng*, vol. 6, no. 1, p. 76, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41378-020-00185-3.

[117] Y. Chen *et al.*, "Sophisticated Interfaces Between Biosensors and Organoids: Advancing Towards Intelligent Multimodal Monitoring Physiological Parameters," *Biosensors*, vol. 15, no. 9, p. 557, Aug. 2025, doi: 10.3390/bios15090557.

[118] Z. Liao *et al.*, "Microfluidic chip coupled with optical biosensors for simultaneous detection of multiple analytes: A review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 126, pp. 697–706, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2018.11.032.

[119] M. Yaghoubi, F. Rahimi, B. Negahdari, A. H. Rezayan, and A. Shafiekhani, "A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 16017, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72457-x.

[120] G. Nonglaton *et al.*, "Technological Advances in Bioproduction: An Innovative Photonic Platform for Real-Time Monitoring of Impurities," in *2024 IEEE BioSensors Conference (BioSensors)*, Cambridge, United Kingdom: IEEE, Jul. 2024, pp. 1–4. doi: 10.1109/BioSensors61405.2024.10712706.

[121] S. Bilal *et al.*, "A review of nanophotonic structures in optofluidic biosensors for food safety and analysis," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 147, p. 104428, May 2024, doi: 10.1016/j.tifs.2024.104428.

[122] S. C. Sajan, A. Singh, P. K. Sharma, and S. Kumar, "Silicon Photonics Biosensors for Cancer Cells Detection—A Review," *IEEE Sensors J.*, vol. 23, no. 4, pp. 3366–3377, Feb. 2023, doi: 10.1109/JSEN.2023.3235920.

[123] M. Lindsay *et al.*, "Scalable hybrid integration of CMOS circuits and fluidic networks for biosensor applications," in *2017 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)*, Torino: IEEE, Oct. 2017, pp. 1–4. doi: 10.1109/BIOCAS.2017.8325553.

[124] M. A. Buttkewitz, C. Heuer, and J. Bahnemann, "Sensor integration into microfluidic systems: trends and challenges," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 83, p. 102978, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.copbio.2023.102978.

[125] J.-S. Chen, P.-F. Chen, H. T.-H. Lin, and N.-T. Huang, "A Localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor integrated automated microfluidic system for multiplex

inflammatory biomarker detection," *Analyst*, vol. 145, no. 23, pp. 7654–7661, 2020, doi: 10.1039/D0AN01201G.

[126] M. R. Bryan, J. N. Butt, J. Bucukovski, and B. L. Miller, "Biosensing with Silicon Nitride Microring Resonators Integrated with an On-Chip Filter Bank Spectrometer," *ACS Sens.*, vol. 8, no. 2, pp. 739–747, Feb. 2023, doi: 10.1021/acssensors.2c02276.

[127] C.-H. Li, C.-Y. Chang, Y.-R. Chen, and C.-S. Huang, "Blood Biomarker Detection Using Integrated Microfluidics with Optical Label-Free Biosensor," *Sensors*, vol. 24, no. 20, p. 6756, Oct. 2024, doi: 10.3390/s24206756.

[128] O. Tokel *et al.*, "Portable Microfluidic Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection," *Sci Rep*, vol. 5, no. 1, p. 9152, Mar. 2015, doi: 10.1038/srep09152.

[129] C. Szydzik *et al.*, "An automated optofluidic biosensor platform combining interferometric sensors and injection moulded microfluidics," *Lab Chip*, vol. 17, no. 16, pp. 2793–2804, 2017, doi: 10.1039/C7LC00524E.

[130] S. R. Shin *et al.*, "Label-Free and Regenerative Electrochemical Microfluidic Biosensors for Continual Monitoring of Cell Secretomes," *Advanced Science*, vol. 4, no. 5, p. 1600522, May 2017, doi: 10.1002/advs.201600522.

[131] J. S. Cognetti *et al.*, "A photonic biosensor-integrated tissue chip platform for real-time sensing of lung epithelial inflammatory markers," *Lab on a Chip*, vol. 23, no. 2, pp. 239–250, 2023, doi: 10.1039/D2LC00864E.

[132] M. A. Ortega *et al.*, "In Situ LSPR Sensing of Secreted Insulin in Organ-on-Chip," *Biosensors*, vol. 11, no. 5, p. 138, Apr. 2021, doi: 10.3390/bios11050138.

[133] J. M. Fernández-Costa *et al.*, "Training-on-a-Chip: A Multi-Organ Device to Study the Effect of Muscle Exercise on Insulin Secretion in Vitro," *Advanced Materials Technologies*, vol. 8, no. 7, p. 2200873, 2023, doi: 10.1002/admt.202200873.

[134] N. B. Arnfinnsdottir, C. A. Chapman, R. C. Bailey, A. Aksnes, and B. T. Stokke, "Impact of Silanization Parameters and Antibody Immobilization Strategy on Binding Capacity of Photonic Ring Resonators," *Sensors*, vol. 20, no. 11, p. 3163, Jun. 2020, doi: 10.3390/s20113163.

[135] J. Y. Lichtenberg, Y. Ling, and S. Kim, "Non-Specific Adsorption Reduction Methods in Biosensing," *Sensors*, vol. 19, no. 11, p. 2488, May 2019, doi: 10.3390/s19112488.

[136] J. S. Cognetti and B. L. Miller, "Real-Time, Continuous Monitoring of Tissue Chips as an Emerging Opportunity for Biosensing," *Sensors*, vol. 25, no. 16, p. 5153, Aug. 2025, doi: 10.3390/s25165153.

[137] A. Mai, C. Mai, and P. Steglich, "From Lab-on-chip to Lab-in-App: Challenges towards silicon photonic biosensors product developments," *Results in Optics*, vol. 9, p. 100317, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.rio.2022.100317.

[138] C. Jamois *et al.*, "Procédé et dispositif d'analyse d'un échantillon, mettant en øeuvre un support résonant," FR1906132, Jun. 2019 [Online]. Available: https://hal.science/hal-02405773

[139] M. Hut *et al.*, "Automated Microfluidic Platform for Single Spheroid Culture and Extracellular Vesicle Isolation: Application to Spheroid Transcriptomic Profiling," *Small*, p. e08115, Oct. 2025, doi: 10.1002/smll.202508115.

[140] S. Rai, U. Bhardwaj, A. Misra, S. Singh, and R. Gupta, "Comparison between photostability of Alexa Fluor 448 and Alexa Fluor 647 with conventional dyes FITC and APC by flow cytometry," *Int J Lab Hematology*, vol. 40, no. 3, Jun. 2018, doi: 10.1111/ijlh.12809.

[141] N. Rochat, A. Troussier, A. Hoang, and F. Vinet, "Multiple internal reflection spectroscopy for quantitative infrared analysis of thin-film surface coating for biological environment," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 23, no. 1–2, pp. 99–103, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0928-4931(02)00239-4.

[142] R. Midahuen, B. Previtali, C. Fontelaye, G. Nonglaton, V. Stambouli, and S. Barraud, "Optimum Functionalization of Si Nanowire FET for Electrical Detection of DNA Hybridization," *IEEE J. Electron Devices Soc.*, vol. 10, pp. 575–583, 2022, doi: 10.1109/JEDS.2022.3166683.

[143] H. Durand *et al.*, "Surface Biofunctionalization of Silicon Photonic Mach-Zehnder Interferometers for Bacterial Biosensor Development," in *2024 IEEE BioSensors Conference (BioSensors)*, Cambridge, United Kingdom: IEEE, Jul. 2024, pp. 1–4. doi: 10.1109/BioSensors61405.2024.10712725.

[144] "Angle de contact – Mesure de la tension superficielle," Linseis. Accessed: Aug. 21, 2023. [Online]. Available: https://www.linseis.com/fr/grandeurs-mesurees/angle-de-contact/

[145] D. Y. Kwok and A. W. Neumann, "Contact angle measurement and contact angle interpretation," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 81, no. 3, pp. 167–249, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0001-8686(98)00087-6.

[146] E. Korin, N. Froumin, and S. Cohen, "Surface Analysis of Nanocomplexes by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 6, pp. 882–889, Jun. 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00040.

[147] D. N. G. Krishna and J. Philip, "Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges," *Applied Surface Science Advances*, vol. 12, p. 100332, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.apsadv.2022.100332.

[148] D. Bahnemann and A. O. T. Patrocinio, Eds., *Springer Handbook of Inorganic Photochemistry*. in Springer Handbooks. Cham: Springer International Publishing, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-63713-2.

[149] A.-G. Bourdat *et al.*, "An integrated microfluidic platform for on-site qPCR analysis: food allergen detection from sample to result," *Lab Chip*, vol. 25, no. 2, pp. 143–154, 2025, doi: 10.1039/D4LC00570H.

[150] *Spectre AlexaFlur 488*. [Online]. Available: https://app.fluorofinder.com/dyes/5-alexa-fluor-488-ex-max-490-nm-em-max-525-nm

[151] B. Van Giel, Y. Meuret, L. Bogaert, H. Murat, H. De Smet, and H. Thienpont, "LED projector with two liquid crystal on silicon light valves and a fly's eye integrator," *Displays*, vol. 29, no. 5, pp. 464–470, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.displa.2008.03.003.

[152] "Fly's Eye Homogenizers." Accessed: Sep. 10, 2025. [Online]. Available: https://www.thorlabs.com

[153] C. Stringer, T. Wang, M. Michaelos, and M. Pachitariu, "Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation," *Nat Methods*, vol. 18, no. 1, pp. 100–106, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41592-020-01018-x.

[154] I. Inc, "Technical Note: Using passive reference dyes for normalization and troubleshooting in qPCR," Illumina Inc., San Diego, CA, USA, Technical Note Publication No. 570-2011-002, 2011. [Online]. Available: https://www.illumina.com/

[155] T. F. Scientific, "ROX passive reference dye for troubleshooting real-time PCR," Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Application Note Application Note CO016741, 2015. [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/

[156] M. Halter *et al.*, "An automated protocol for performance benchmarking a widefield fluorescence microscope," *Cytometry Pt A*, vol. 85, no. 11, pp. 978–985, Nov. 2014, doi: 10.1002/cyto.a.22519.

[157] A. E. Ongaro *et al.*, "Engineering a sustainable future for point-of-care diagnostics and single-use microfluidic devices," *Lab Chip*, vol. 22, no. 17, pp. 3122–3137, 2022, doi: 10.1039/D2LC00380E.

[158] A. Kostapanou, K.-R. Chatzipanagiotou, S. Damilos, F. Petrakli, and E. P. Koumoulos, "Safe-and-Sustainable-by-Design Framework: (Re-)Designing the Advanced Materials Lifecycle," *Sustainability*, vol. 16, no. 23, p. 10439, Nov. 2024, doi: 10.3390/su162310439.

[159] C. Caldeira *et al.*, *Safe and sustainable by design chemicals and materials: review of safety and sustainability dimensions, aspects, methods, indicators, and tools*. in JRC technical report, no. 30991. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2022. doi: 10.2760/879069.

[160] M. Hut *et al.*, "Automated Microfluidic Platform for Single Spheroid Culture and Extracellular Vesicle Isolation: Application to Spheroid Transcriptomic Profiling," *Small*, p. e08115, Oct. 2025, doi: 10.1002/smll.202508115.

[161] F. Forouzandeh, A. Arevalo, A. Alfadhel, and D. A. Borkholder, "A review of peristaltic micropumps," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 326, p. 112602, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.sna.2021.112602.

[162] Y. Juste-Lanas, S. Hervas-Raluy, J. M. García-Aznar, and A. González-Loyola, "Fluid flow to mimic organ function in 3D *in vitro* models," *APL Bioengineering*, vol. 7, no. 3, p. 031501, Sep. 2023, doi: 10.1063/5.0146000.

[163] "Q2(R2) Validation of Analytical Procedures," 2024.

[164] F. Rizzo, "Optical Immunoassays Methods in Protein Analysis: An Overview," *Chemosensors*, vol. 10, no. 8, p. 326, Aug. 2022, doi: 10.3390/chemosensors10080326.

[165] S. Aydin *et al.*, "An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids," *J Int Med Res*, vol. 53, no. 2, p. 03000605251315913, Feb. 2025, doi: 10.1177/03000605251315913.

[166] K. Gajos, A. Orzech, K. Sanocka, P. Petrou, and A. Budkowski, "Covalent and Non-covalent In-Flow Biofunctionalization for Capture Assays on Silicon Chips: White Light Reflectance Spectroscopy Immunosensor Combined with TOF-SIMS Resolves Immobilization Stability and Binding Stoichiometry," *Langmuir*, vol. 39, no. 29, pp. 10216–10229, Jul. 2023, doi: 10.1021/acs.langmuir.3c01181.

[167] N. S. K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur, and S. K. Mitra, "Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker," *Applied Surface Science*, vol. 305, pp. 522–530, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.03.130.

[168] P. Li, A. J. Sherry, J. A. Cortes, C. Anagnostopoulos, and M. Faghri, "A blocking-free microfluidic fluorescence heterogeneous immunoassay for point-of-care diagnostics," *Biomed Microdevices*, vol. 13, no. 3, pp. 475–483, Jun. 2011, doi: 10.1007/s10544-011-9515-9.

[169] Y. Wang, D. I. Adeoye, Y. J. Wang, and M. G. Roper, "Increasing insulin measurement throughput by fluorescence anisotropy imaging immunoassays," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1212, p. 339942, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.aca.2022.339942.

[170] T. Wang, M. Zhang, D. D. Dreher, and Y. Zeng, "Ultrasensitive microfluidic solid-phase ELISA using an actuatable microwell-patterned PDMS chip," *Lab Chip*, vol. 13, no. 21, p. 4190, 2013, doi: 10.1039/c3lc50783a.

[171] H. K. Ramiya Ramesh Babu and L. A. Gheber, "Fluorescence-based kinetic analysis of miniaturized protein microarrays," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 122, pp. 290–299, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.09.051.

[172] O. Calvo-Lozano *et al.*, "Label-Free Plasmonic Biosensor for Rapid, Quantitative, and Highly Sensitive COVID-19 Serology: Implementation and Clinical Validation," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 2, pp. 975–984, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c03850.

[173] R. Funari, K.-Y. Chu, and A. Q. Shen, "Detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein by gold nanospikes in an opto-microfluidic chip," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 169, p. 112578, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112578.

[174] M. Angelopoulou, D. Kourti, K. Misiakos, A. Economou, P. Petrou, and S. Kakabakos, "Mach-Zehnder Interferometric Immunosensor for Detection of Aflatoxin M1 in Milk, Chocolate Milk, and Yogurt," *Biosensors*, vol. 13, no. 6, p. 592, May 2023, doi: 10.3390/bios13060592.

[175] G. Besselink *et al.*, "Asymmetric Mach–Zehnder Interferometric Biosensing for Quantitative and Sensitive Multiplex Detection of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Human Plasma," *Biosensors*, vol. 12, no. 8, p. 553, Jul. 2022, doi: 10.3390/bios12080553.

[176] T.-C. Chang, C.-C. Wu, S.-C. Wang, L.-K. Chau, and W.-H. Hsieh, "Using A Fiber Optic Particle Plasmon Resonance Biosensor To Determine Kinetic Constants of Antigen–Antibody Binding Reaction," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 245–250, Jan. 2013, doi: 10.1021/ac302590n.

[177] J. Homola, "Present and future of surface plasmon resonance biosensors," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, no. 3, pp. 528–539, Oct. 2003, doi: 10.1007/s00216-003-2101-0.

[178] J. S. Kuo and D. T. Chiu, "Controlling Mass Transport in Microfluidic Devices," *Annual Rev. Anal. Chem.*, vol. 4, no. 1, pp. 275–296, Jul. 2011, doi: 10.1146/annurev-anchem-061010-113926.

[179] V. Mazzaracchio, M. Rios Maciel, T. Porto Santos, K. Toda-Peters, and A. Q. Shen, "Duplex Electrochemical Microfluidic Sensor for COVID-19 Antibody Detection: Natural versus Vaccine-Induced Humoral Response," *Small*, vol. 19, no. 51, p. 2207731, 2023, doi: 10.1002/smll.202207731.

[180] C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, "Microfluidic Immunoassays," *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, no. 3, pp. 253–274, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.jala.2010.01.013.

[181] K. C. Tjandra *et al.*, "Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing," *Antibiotics*, vol. 11, no. 4, p. 511, Apr. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040511.

[182] S. T. Sanjay, M. Li, W. Zhou, X. Li, and X. Li, "A reusable PMMA/paper hybrid plug-and-play microfluidic device for an ultrasensitive immunoassay with a wide dynamic range," *Microsyst Nanoeng*, vol. 6, no. 1, p. 28, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41378-020-0143-5.

[183] X. Zhou, T. Kasama, and R. Miyake, "Rapid and highly sensitive immunoassay using an ultra-thin immuno-wall microfluidic device with a sequential fluorescence signal increment method," *Anal Bioanal Chem*, vol. 417, no. 17, pp. 3935–3944, Jul. 2025, doi: 10.1007/s00216-025-05916-x.

[184] A. Oushabi, "The pull-out behavior of chemically treated lignocellulosic fibers/polymeric matrix interface (LF/PM): A review," *Composites Part B: Engineering*, vol. 174, p. 107059, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2019.107059.

[185] J. M. Antonucci, S. H. Dickens, B. O. Fowler, and H. H. K. ; Xu, "Chemistry of silanes: Interfaces in dental polymers and composites," *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 110, no. 5, p. 541, Sep. 2005, doi: 10.6028/jres.110.081.

[186] A. Issa and A. Luyt, "Kinetics of Alkoxysilanes and Organoalkoxysilanes Polymerization: A Review," *Polymers*, vol. 11, no. 3, p. 537, Mar. 2019, doi: 10.3390/polym11030537.

[187] H. Id, "Interaction Organosilanes / Silice de précipitationDu milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux".

[188] Y. Millot, A. Hervier, J. Ayari, N. Hmili, J. Blanchard, and S. Boujday, "Revisiting Alkoxysilane Assembly on Silica Surfaces: Grafting versus Homo-Condensation in Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 145, no. 12, pp. 6671–6681, Mar. 2023, doi: 10.1021/jacs.2c11390.

[189] M. Sypabekova, A. Hagemann, D. Rho, and S. Kim, "Review: 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) Deposition Methods on Oxide Surfaces in Solution and Vapor Phases for Biosensing Applications," *Biosensors*, vol. 13, no. 1, p. 36, Dec. 2022, doi: 10.3390/bios13010036.

[190] Y. Han, D. Mayer, A. Offenhäusser, and S. Ingebrandt, "Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization," *Thin Solid Films*, vol. 510, no. 1–2, pp. 175–180, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.tsf.2005.11.048.

[191] D. Murugan *et al.*, "Comparative Study of Surface Activation Steps for Thermally Grown Oxide Interface and Optimal Silanization," *Physica Status Solidi (a)*, vol. 220, no. 22, p. 2300294, Nov. 2023, doi: 10.1002/pssa.202300294.

[192] Y. Kato, M.-C. Jung, M. V. Lee, and Y. Qi, "Electrical and optical properties of transparent flexible electrodes: Effects of UV ozone and oxygen plasma treatments," *Organic Electronics*, vol. 15, no. 3, pp. 721–728, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.orgel.2014.01.002.

[193] P. Verding *et al.*, "The Influence of UV–Ozone, O_2 Plasma, and CF_4 Plasma Treatment on the Droplet-Based Deposition of Diamond Nanoparticles," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 16, no. 1, pp. 1719–1726, Jan. 2024, doi: 10.1021/acsami.3c14014.

[194] A. Delplanque, E. Henry, J. Lautru, H. Leh, M. Buckle, and C. Nogues, "UV/ozone surface treatment increases hydrophilicity and enhances functionality of SU-8 photoresist polymer," *Applied Surface Science*, vol. 314, pp. 280–285, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.06.053.

[195] P. H. Mutin, G. Guerrero, and A. Vioux, "Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules," *J. Mater. Chem.*, vol. 15, no. 35–36, p. 3761, 2005, doi: 10.1039/b505422b.

[196] C. J. Brinker, "Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 100, no. 1–3, pp. 31–50, Mar. 1988, doi: 10.1016/0022-3093(88)90005-1.

[197] T. Linhares, M. T. Pessoa de Amorim, and L. Durães, "Silica aerogel composites with embedded fibres: a review on their preparation, properties and applications," *J. Mater. Chem. A*, vol. 7, no. 40, pp. 22768–22802, 2019, doi: 10.1039/C9TA04811A.

[198] R. K. Iler, "The chemistry of silica solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry," *John Wiley & Sons,Inc., Hoboken*, 1979.

[199] G. D. Nagare and S. Mukherji, "Characterization of silanization and antibody immobilization on spin-on glass (SOG) surface," *Applied Surface Science*, vol. 255, no. 6, pp. 3696–3700, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.apsusc.2008.10.033.

[200] E. J. A. Pope and J. D. MACKENZIE, "Sol-gel processing of silica," *Journal of Non-Crystalline Solids 87*, p. 185, 1986.

[201] J. Kim, P. Seidler, L. S. Wan, and C. Fill, "Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 329, no. 1, pp. 114–119, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.jcis.2008.09.031.

[202] H. E. Bergna, "The Colloid Chemistry of Silica".

[203] A. M. Abu El-Soad, G. Lazzara, A. V. Pestov, G. Cavallaro, N. A. Martemyanov, and E. G. Kovaleva, "Effect of Polarity of Solvent on Silanization of Halloysite Nanoclay Using (3-Glycidyloxy propyl) Trimethoxy Silane," *J Inorg Organomet Polym*, vol. 31, no. 6, pp. 2569–2578, Jun. 2021, doi: 10.1007/s10904-020-01868-0.

[204] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, "Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption," *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 656–665, Jan. 2012, doi: 10.1021/la2036778.

[205] N. B. Arnfinnsdottir, C. A. Chapman, R. C. Bailey, A. Aksnes, and B. T. Stokke, "Impact of Silanization Parameters and Antibody Immobilization Strategy on Binding Capacity of Photonic Ring Resonators," *Sensors*, vol. 20, no. 11, p. 3163, Jun. 2020, doi: 10.3390/s20113163.

[206] J. A. Howarter and J. P. Youngblood, "Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane," *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 11142–11147, Dec. 2006, doi: 10.1021/la061240g.

[207] E. P. Luta and B. L. Miller, "Development of Methods for Specific Capture of Biological Targets on Aluminum Substrates: Application to Bacillus subtilis Spore Detection as a Model for Anthrax," *Sensors*, vol. 22, no. 9, p. 3441, Apr. 2022, doi: 10.3390/s22093441.

[208] C.-A. Vu, H.-Y. Lai, C.-Y. Chang, H. W.-H. Chan, and W.-Y. Chen, "Optimizing surface modification of silicon nanowire field-effect transistors by polyethylene glycol for MicroRNA detection," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 209, p. 112142, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112142.

[209] Y. Gidi, S. Bayram, C. J. Ablenas, A. S. Blum, and G. Cosa, "Efficient One-Step PEG-Silane Passivation of Glass Surfaces for Single-Molecule Fluorescence Studies," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 46, pp. 39505–39511, Nov. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b15796.

[210] K. Ma and U. Wiesner, "Modular and Orthogonal Post-PEGylation Surface Modifications by Insertion Enabling Penta-Functional Ultrasmall Organic-Silica Hybrid Nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 29, no. 16, pp. 6840–6855, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.7b02009.

[211] K. K. Nakashima, M. H. I. van Haren, A. A. M. André, I. Robu, and E. Spruijt, "Active coacervate droplets are protocells that grow and resist Ostwald ripening," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, Art. no. 1, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24111-x.

[212] M. J. Oh, I. Kownacki, and J. Ortyl, "'Silatranization': Surface modification with silatrane coupling agents," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 346, p. 103649, Dec. 2025, doi: 10.1016/j.cis.2025.103649.

[213] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, "Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption," *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 656–665, Jan. 2012, doi: 10.1021/la2036778.

[214] R. Vos *et al.*, "Chemical Vapor Deposition of Azidoalkylsilane Monolayer Films," *Langmuir*, vol. 34, no. 4, pp. 1400–1409, Jan. 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b04011.

[215] J. Halford and C. Chen, "The Role of APTES as a Primer for Polystyrene Coated AA2024-T3," *Micromachines*, vol. 15, no. 1, p. 93, Dec. 2023, doi: 10.3390/mi15010093.

[216] E. A. Silva, F. Z. Trindade, H. N. J. F. Reskalla, and J. R. C. D. Queiroz, "Heat treatment following surface silanization in rebonded tribochemical silica-coated ceramic brackets: shear bond strength analysis," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 21, no. 4, pp. 335–340, Jul. 2013, doi: 10.1590/1678-775720130012.

[217] F. P. Byrne *et al.*, "Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides," *Sustain Chem Process*, vol. 4, no. 1, p. 7, Dec. 2016, doi: 10.1186/s40508-016-0051-z.

[218] M. Tobiszewski, M. Marć, A. Gałuszka, and J. Namieśnik, "Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry," *Molecules*, vol. 20, no. 6, pp. 10928–10946, Jun. 2015, doi: 10.3390/molecules200610928.

[219] N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, "A Strain-Promoted [3 + 2] Azide−Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 46, pp. 15046–15047, Nov. 2004, doi: 10.1021/ja044996f.

[220] G. Wittig and A. Krebs, "Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I," *Chem. Ber.*, vol. 94, no. 12, pp. 3260–3275, Dec. 1961, doi: 10.1002/cber.19610941213.

[221] N. Cohen *et al.*, "Microsphere based continuous-flow immunoassay in a microfluidic device for determination of clinically relevant insulin levels," *Microchim Acta*, vol. 184, no. 3, pp. 835–841, Mar. 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2072-z.

[222] A. De Masi, P. L. Scognamiglio, E. Battista, P. A. Netti, and F. Causa, "Hydrogel particles-on-chip (HyPoC): a fluorescence micro-sensor array for IgG immunoassay," *Lab Chip*, vol. 23, no. 10, pp. 2458–2468, 2023, doi: 10.1039/D2LC01080A.

[223] E. P. Kartalov, J. F. Zhong, A. Scherer, S. R. Quake, C. R. Taylor, and W. French Anderson, "High-Throughput Multi-Antigen Microfluidic Fluorescence Immunoassays," *BioTechniques*, vol. 40, no. 1, pp. 85–90, Jan. 2006, doi: 10.2144/000112071.

[224] M. A. Model and J. K. Burkhardt, "A standard for calibration and shading correction of a fluorescence microscope," *Cytometry*, vol. 44, no. 4, pp. 309–316, Aug. 2001, doi: 10.1002/1097-0320(20010801)44:4<309::AID-CYTO1122>3.0.CO;2-3.

[225] M. Model, "Intensity Calibration and Flat-Field Correction for Fluorescence Microscopes," *CP Cytometry*, vol. 68, no. 1, Apr. 2014, doi: 10.1002/0471142956.cy1014s68.

« Tous les livres, qu'importe leur reliure, finiront par tomber en poussière. Il en ira peut-être autrement des histoires qu'ils recèlent. Elles survivront peut-être au papier, à la bibliothèque, à la langue même dans laquelle elles furent écrites. »

Mark Lawrence, Le livre qui refusait de brûler.