

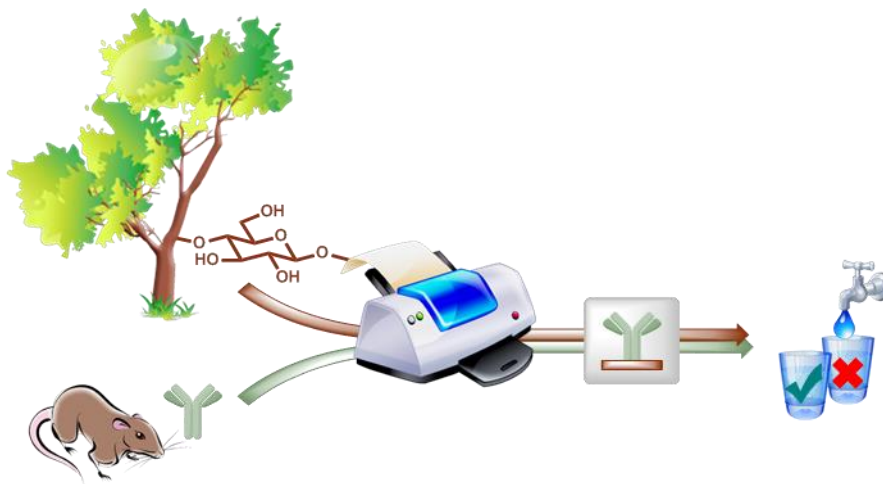
# Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

*Spécialité : Science des matériaux*

*Présentée par*  
**Julie CREDOU**

**SIMPLE, BIOCOMPATIBLE AND ROBUST MODIFICATION OF CELLULOSE  
MEMBRANES FOR THE ECO<sup>2</sup>-FRIENDLY PREPARATION OF  
IMMUNOASSAY DEVICES**

**MODIFICATION SIMPLE, BIOCOMPATIBLE ET ROBUSTE DE MEMBRANES  
DE CELLULOSE POUR LA PREPARATION ECOLOGIQUE ET ECONOMIQUE  
DE DISPOSITIFS D'IMMUNOANALYSE**



***Soutenance prévue le 18 Septembre 2014 devant le jury composé de :***

<b>Dr. Vincent HUC</b>	<i>Université Paris-Sud</i>	Rapporteur
<b>Pr. Nicole JAFFREZIC</b>	<i>Université Claude Bernard Lyon 1</i>	Rapporteur
<b>Pr. Vincent SOL</b>	<i>Université de Limoges</i>	Examineur
<b>Pr. Laura FIONI</b>	<i>Ecole Polytechnique</i>	Examineur
<b>Dr. Thomas BERTHELOT</b>	<i>CEA Saclay</i>	Directeur de Thèse

## Popularized Abstract

---

Current global issues have stimulated the search for both ecologically and economically friendly (eco<sup>2</sup>-friendly) materials and processes. As an abundant natural polymer, cellulose is an ideal material for sustainable technologic development. Beyond writing paper, cellulose finds applications in clinical monitoring with simple detection devices such as pregnancy test strips. Recently, detection technologies have trended towards platforms allowing for recognition of several target molecules per sample in a single run. This evolution challenges the whole production process of such devices. Both the frame material and its treatments should be eco<sup>2</sup>-friendly. In this perspective, three processes for modification of cellulose sheets were developed: two methods for strongly immobilizing proteins while preserving their activity, and one for increasing cellulose functionality. All are powerful tools for easy modulation of cellulose sheet properties under soft and biocompatible conditions.

## Abstract

---

Since the *papyri*, cellulose has played a significant role in human culture, especially as paper. Nowadays, this ancient product has found new applications in the expanding sector of bioactive paper. Simple paper-based detection devices such as lateral flow immunoassays (LFIAs) are inexpensive, rapid, user-friendly and therefore highly promising for providing resource-limited settings with point-of-care diagnostics. Recently, paper-based biosensing technology has trended towards three-dimensional microfluidic devices and multiplexed assay platforms. Yet, many multiplexed paper-based biosensors implement methods incompatible with the conventional LFIA carrier material: nitrocellulose. It thus tends to be replaced by pure cellulose. This major material change implies to undertake a covalent immobilization of biomolecules on cellulose which preserves their biological activity.

Furthermore, the current global issues have stimulated the search for both ecologically and economically friendly (eco<sup>2</sup>-friendly) materials and processes. As a sustainable and affordable biopolymer, cellulose is an ideal material for developing diagnostic devices. However, the frame material is not the only aspect to consider. The whole device design and production, as well as the biosensing material immobilization or the non-sensing membranes treatment, should be as eco<sup>2</sup>-friendly as possible. Hence, the spatially controlled modification of cellulose surface seems crucial in the development of such devices since it enables to save expensive matter and to pattern surface properties. In any case, modification procedures should abide by the economic and ecological objectives aforementioned.

In this perspective, three processes allowing easy, robust and sustainable modification of cellulose sheets were developed. All are environmentally friendly, simple, time and cost-saving, and versatile.

The first procedure is a functionalization of cellulose membranes for covalent antibody immobilization. While cellulose chemical modification is usually operated under harsh conditions in organic solvents, the diazonium-based procedure developed was performed in water, at room temperature, in a single step. Paper sheets have thus been modified and bear different chemical functions which enable to graft biomolecules by common bioconjugate techniques and to perform LFIAs.

The second is a chemical-free photoimmobilization procedure which allowed antibodies to be immobilized on cellulose without any photocoupling intermediate nor any biomolecule or substrate pretreatment. This immobilization technique was further combined to inkjet printing to localize the antibodies according to any desired pattern. Native antibodies have thus been printed and immobilized on paper sheets which therefore enable to perform LFIAs. Membranes' performances were evaluated in terms of visual detection limit and challenged nitrocellulose performances.

The third is a modification of cellulose membranes by polymer grafting. Unlike the two previous processes, this technique was developed in order to increase the functionality of the non-sensing cellulose parts of paper-based devices. Yet, it may be employed as another functionalization method for covalent antibody immobilization on cellulose. While cellulose graft copolymerization is usually performed through complex and expensive procedures, the diazonium-based approach employed was performed in water, at room temperature, in a short single step. Cellulose sheets have thus been grafted with several acrylic polymers, first globally through a dipping procedure and then locally by inkjet printing.

All the strategies developed herein would be helpful to immobilize sensitive proteins on selected specific areas of cellulose sheets. More generally, these are powerful tools for easy and rapid modulation of cellulose surface properties according to complex designs, under soft and biocompatible conditions.

## Résumé vulgarisé

---

Les enjeux mondiaux actuels incitent à se tourner vers des matériaux et procédés à la fois respectueux de l'environnement et rentables économiquement. La cellulose est un polymère naturel abondant et donc un matériau idéal pour un développement technologique durable. Au delà du papier, la cellulose est présente dans des dispositifs de détection simples tels que les tests de grossesse. Récemment, ce type de système a évolué vers des plateformes permettant la reconnaissance de plusieurs cibles par échantillon testé. De tels dispositifs doivent répondre aux défis écologique et économique, aussi bien par le matériau utilisé que par ses traitements. Dans ce contexte, trois procédés de modification de feuilles de cellulose ont été développés : deux pour immobiliser des protéines en préservant leur activité, et un pour augmenter la fonctionnalité de la cellulose. Tous sont de puissants outils pour facilement moduler les propriétés des feuilles de celluloses dans des conditions biocompatibles.

## Résumé

---

Depuis le *papyrus*, la cellulose a tenu un rôle important dans notre culture, en particulier comme papier. Aujourd'hui, ce produit ancien trouve de nouvelles applications dans le secteur des papiers bioactifs. Des dispositifs de détection faits de papier tels que les bandelettes sont peu coûteux, rapides, faciles à utiliser, et donc très prometteurs pour le diagnostic de terrain dans les zones reculées. Récemment, les biocapteurs papier ont évolué vers des dispositifs microfluidiques 3D et des plateformes multiplexées. Or, le développement de ces biocapteurs papier multiplexés fait souvent appel à des méthodes incompatibles avec le matériau classique des bandelettes : la nitrocellulose. Celle-ci tend donc à être remplacée par la cellulose. Ce changement de matériau implique la mise en œuvre d'une immobilisation covalente des biomolécules qui préserve leur activité biologique.

Par ailleurs, les enjeux mondiaux actuels incitent à se tourner vers des matériaux et procédés à la fois respectueux de l'environnement et rentables économiquement. La cellulose est un polymère naturel abondant et donc un matériau idéal pour le développement de dispositifs de diagnostic. Toutefois, le matériau support n'est pas le seul aspect à considérer. L'ensemble de la conception du dispositif, l'immobilisation des agents de capture, le traitement des membranes, tout doit répondre aux défis écologiques et économiques. La modification localisée des surfaces de cellulose semble alors cruciale puisqu'elle permet d'économiser des composés coûteux et de moduler localement les propriétés de surface.

Dans ce contexte, trois procédés de modification facile et durable de feuilles de cellulose ont été développés. Tous sont respectueux de l'environnement, simples, polyvalents et économes aussi bien en temps qu'en argent.

Le premier est une procédure de fonctionnalisation de membranes de cellulose pour l'immobilisation covalente d'anticorps. Tandis que la modification chimique de la cellulose se fait habituellement dans des conditions rudes et dans des solvants organiques, la méthode développée ici a été réalisée dans l'eau, à température ambiante, en une seule étape. Des feuilles de papier ont ainsi été modifiées, portant alors différentes fonctions chimiques permettant de greffer des biomolécules par des techniques de bioconjugaison classiques. Elles ont ensuite été testées comme bandelettes.

Le second est une procédure de photoimmobilisation sans produit chimique qui permet d'immobiliser des anticorps sur la cellulose sans aucun intermédiaire de couplage ni aucun prétraitement des biomolécules ou du substrat. Cette technique a été combinée à l'impression jet d'encre pour localiser les anticorps selon tout motif désiré. Des anticorps natifs ont ainsi été imprimés et immobilisés sur des feuilles de papier qui ont ensuite servi de bandelettes. Leurs performances ont été évaluées en termes de limite de détection et se sont montrées comparables à celles de la nitrocellulose.

Le troisième est une méthode de greffage de polymères sur membranes de cellulose. Contrairement aux précédents, ce procédé vise à augmenter la fonctionnalité des portions non-déetectrices des dispositifs papier. Mais il peut aussi être utilisé comme une autre méthode de fonctionnalisation pour l'immobilisation covalente d'anticorps. Alors que le greffage de polymères sur cellulose se fait d'ordinaire par des procédures complexes et coûteuses, l'approche employée ici a été réalisée dans l'eau, à température ambiante, en une seule et courte étape. Des feuilles de cellulose ont ainsi été greffées de divers polyacryliques, d'abord globalement par trempage puis localement par impression.

Toutes ces stratégies peuvent aider à immobiliser de manière localisée des protéines sensibles sur des feuilles de cellulose. Plus généralement, ce sont de puissants outils pour facilement moduler les propriétés des surfaces de celluloses selon des motifs complexes, dans des conditions douces et biocompatibles.