



HAL
open science

Développement d'une technologie hybride à base de microbilles pour la détection d'anticorps IgE : vers le diagnostic d'allergies

Anthony Leonard

► **To cite this version:**

Anthony Leonard. Développement d'une technologie hybride à base de microbilles pour la détection d'anticorps IgE : vers le diagnostic d'allergies. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAY061 . tel-02053703

HAL Id: tel-02053703

<https://theses.hal.science/tel-02053703>

Submitted on 1 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Anthony LEONARD

Thèse dirigée par **David PEYRADE**

et codirigée par **Marc ZELSMANN**

préparée au sein du **Laboratoire des Technologies de la
Microélectronique**
dans l'**École Doctorale de Physique de Grenoble**

Développement d'une technologie hybride à base de microbilles pour la détection d'anticorps IgE : vers le diagnostic d'allergies

Thèse soutenue publiquement le **27 novembre 2018**, devant le jury
composé de :

Serge Ravaine

Professeur, Centre de Recherche Paul Pascal, Rapporteur

Pierre Rougé,

Professeur Emérite UPS, Université Paul Sabatier, Rapporteur

Patrice Marche

Directeur de Recherche INSERM, IAB, Examineur, Président du jury

Paul Kauffmann

CEO, MagIA Diagnostics, Examineur

Jacques Bienvenu

Professeur Emérite, HCL, Invité

David Peyrade

Directeur de Recherche CNRS, LTM, Directeur de thèse

Marc Zelsmann

Chargé de Recherche CNRS, LTM, Codirecteur de thèse



Remerciements

Cette thèse a débuté le 1^{er} octobre 2014 et s'est terminée le 27 novembre 2018. Cela aura été une formidable aventure humaine qui m'aura poussé dans mes limites et où j'ai beaucoup appris sur moi-même. Il y a eu des haut et des bas, des bonnes surprises et parfois des moins bonnes. Je suis très fier du travail que nous avons réalisé au cours de ces années de thèse. J'ai beaucoup appris scientifiquement et humainement et tout ce travail n'aurait jamais été possible sans l'aide précieuse de nombreuses personnes.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier les membres du jury : Patrice Marche, Paul Kauffmann, Pierre Rougé et Serge Ravaine. Merci d'avoir été honnête et d'avoir émis des remarques pertinentes et précises sur les qualités et les défauts de mes travaux de recherche.

Merci à David et à Marc de m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse pluridisciplinaire au sein du LTM.

Je tiens à remercier Jacques, Françoise et Lorna de l'hôpital des hospices civiles de Lyon ainsi qu'Aleksandra et Annick du laboratoire de recherche PharmaDev à Toulouse. Merci de m'avoir accueilli, d'avoir su me conseiller pour orienter mes recherches judicieusement et de m'avoir formé aux différentes techniques de biochimie. Merci aux différentes discussions scientifiques nécessaire pour la réalisation de ce doctorat.

Je tiens à remercier la start-up Smart Force Technologies avec laquelle j'ai collaboré au cours de ces quatre années. Merci à Julien et à Olivier pour tous les bons moments passés ensemble, merci pour les bons conseils prodigués au cours de ma thèse notamment dans les moments les plus compliqués. Merci de votre soutien et merci pour la dosette... Un grand merci à Alice pour tous les moments de folie que nous avons passé ensemble durant les manips, nos discussions sur les séries, et merci de m'avoir appris ce qu'était vraiment le charisme, d'être unique, les nerfs et le talent.

Du LTM, je tiens à remercier :

- Tona pour sa gentillesse, sa générosité, sa bienveillance, sa très grande rigueur dans son travail, sa bienveillance, son aide précieuses pour les expériences de tri magnétiques et les mesures de spectrophotométrie et ses cadeaux du Mexique.
- Marianne et Roberto pour leur courage d'aller au bout de leur combat.
- Samia pour la bonne humeur, l'énergie et le sourire qu'elle m'a communiqué tout au long de ma thèse.
- Merci à Javier pour m'avoir appris le mandarin.
- Merci à Manon pour les nombreuses pauses « thé » passées ensemble.
- Merci à Alexis pour l'aide sur les dispositifs lens-less et le merveilleux comté.
- Merci à Antoine pour les séances cinémas et les parties de tarots.
- Merci à Victor pour les « innombrables » conversations toujours très intéressantes et surtout merci les diverses préparations d'échantillons en salle blanche.
- Merci à Malou et à Sylvaine de gérer le secrétariat dans la bonne humeur.

Je tiens à remercier Tiphaine ma cobureau de toujours. Cela a été un vrai plaisir de partager ce bureau et notre passion commune pour les sciences appliquées. Merci de ton soutien sans faille

dans les moments les plus durs. J'ai été très fier et honoré de partager cette aventure, si particulière, avec toi.

Cette thèse s'est également construite lors de mes nombreuses expériences extra-professionnelles.

Je tiens à remercier Looping et Claire pour leurs grands talents artistiques et les différentes conversations enrichissantes eues au cours de ces 4 années.

De la même manière, je souhaite remercier la dream-team qui m'a accompagné au cours de cette thèse : Joran, M. Petrizelli, Françoise, Cathy et Stéphane, cette thèse aurait été cent fois plus difficiles sans votre aide.

Un remerciement tout particulier à mes deux professeurs de théâtre qui m'ont beaucoup appris : premièrement pour Sylvie Chalubert qui m'a appris l'improvisation, la bienveillance du lâcher prise et tellement d'autres choses. Un grand merci à Guillaume Lavie pour m'avoir enseigné la sincérité dans le jeu d'acteur et les autres techniques de comédiens. Je tiens à remercier les différents endroits où j'ai pratiqué le théâtre au cours de ces quatre années : le Tigre, l'Atelier du 8, la Basse-cour, la Ligue Impro38 et l'Ecole des gens. Le théâtre a été lors de ma thèse un formidable exutoire me permettant de vider mon esprit, de m'amuser et de me défouler une fois par semaine, ce qui me m'a permis de gagner en sérénité lors de mes travaux de recherches.

Un remerciement particulier à Edwin et Alix ainsi qu'aux licornes qui les accompagnent.

Je voudrais remercier ma famille : mes parents qui m'ont aidé financièrement depuis le début de mes études. Un grand merci à mon petit frère Alex, à ma cousine Sarah avec ses trois hommes : son mari Fred et ses petits bouts de chou : Edgar et Leon. Merci à Marie, Dom, Nono, Manu, Pierre-Yves, Doreen, Jean-Luc, Corinne, Lolo, François, Marie-Hélène, Philippe, Valy, et Noly.

Merci également aux personnes que j'ai oublié de remercier et que j'ai rencontré, croisé et/ou discuté durant l'aventure de la thèse.

« Toute connaissance commence par les sentiments »

Léonard de Vinci

Résumé

Les allergies représentent un enjeu sociétal majeur dans nos sociétés modernes. Les outils de diagnostics actuels permettent la mesure de concentration d'anticorps spécifiques IgE responsables des réactions allergiques contenus dans le sérum de patient. L'intégration de nano-microparticules diminue les distances de diffusion permettant de miniaturiser les dispositifs, de diminuer le temps de réaction et d'améliorer l'efficacité du diagnostic. C'est dans cette perspective que cette thèse se positionne en développant une méthode innovante de détection des anticorps IgE par l'utilisation de microbilles polystyrènes (PS) 10 μm et superparamagnétiques 1 μm (SPM).

L'idée explorée dans cette thèse est d'utiliser les microbilles PS comme support d'immunodosage et les propriétés magnétiques des microbilles SPM en réalisant un tri magnétique des microbilles PS. Nous avons développé cette technologie en trois étapes technologiques distinctes. Premièrement, la bio-fonctionnalisation a permis le greffage des allergènes et des anticorps à la surface des microbilles qui réagissent ensuite avec le sérum de patient. Puis, le tri magnétique a été développé pour isoler les microbilles PS en fonction de la présence ou non d'anticorps IgE à leur surface. L'efficacité de ce procédé est proportionnelle à la quantité d'IgE par microbilles. Finalement, une technologie d'auto-assemblage de microbilles appelées « assemblage gravitationnel » a été développée en exploitant avantageusement les phénomènes de sédimentation et de capillarité. Il a été montré que cette technologie complémentaire à la technologie d'assemblage capillaire étend le domaine de l'assemblage à des systèmes de suspensions colloïdales denses. De plus, cette technologie permet d'atteindre une limite de détection de 2 microbilles/ml.

Des tests cliniques ont été réalisés avec succès à partir de sérums de patient sensibles aux extraits d'arachide, de noisette et de crevette. Le temps de procédé, la limite ainsi que la dynamique de détection ont été optimisés. La preuve de concept de détection des anticorps IgE a été présentée et ouvre la voie vers le diagnostic des allergies multiplexe.

Abstract

Development of a microbead-based hybrid technology for IgE antibody detection : towards the allergy diagnosis

Allergies represent a major social issue for modern societies. Current diagnostic tools enable to measure the concentration of specific IgE antibodies responsible for allergic responses into the patient's serum. The use of nano-micro particles decreases diffusion distances in order to shrink the size of devices, to reduce the length of time reaction and to improve diagnostic efficiency. In this perspective, the aim of this PhD work was to develop an innovative method for the detection of IgE antibodies by using both 10 μ m polystyrene (PS) and 1 μ m superparamagnetic (SPM) microbeads.

The PhD explores this idea by using both PS microbeads as support of immunoassay and magnetic properties of SPM microbeads in order to perform a magnetic sorting of PS microbeads. We have developed this technology in 3 different technological steps. First, biofunctionalization is used to link allergens and antibodies onto the surface of microbeads intended to react with serum patient. Then, the magnetic sorting has been developed to isolate PS microbeads depending on the presence / absence of IgE antibodies onto their surface. The efficiency of such a process is proportional to IgE quantity per microbeads. Finally, a self-assembly process of microbeads called « gravitational assembly » has been developed by studying sedimentation and capillary phenomenon. It has been shown that this complementary technology to the capillary assembly technology extend the scope of assembly to dense system of colloidal suspension. In addition, this technology has reached a detection limit of 2 microbeads per ml.

Clinical trials have been successfully performed from allergic serum patient to peanut, hazelnut and shrimp. Process time, detection limit and dynamic range of the detection system have been investigated and optimized. The proof of concept of IgE antibodies detection have been demonstrated. These results point the way towards the multiplex diagnosis of allergies.

Table des matières

Abréviations, sigles et acronymes	11
Introduction générale	12
Chapitre 1 : Etat de l'art	14
1.1 Comprendre les allergies.....	15
1.1.1 Un enjeu sociétal fort	15
1.1.2 Les allergènes	15
1.1.3 L'allergie IgE reliée.....	16
1.2 Diagnostics des allergies	17
1.2.1 Test <i>in-vivo</i> de provocation sur la peau : test de Prick.....	17
1.2.2 Test <i>in-vitro</i> : principe de l'immunodosage en « sandwich ».....	18
1.2.3 Les outils de diagnostics d'allergies <i>in-vitro</i> commercialisées	19
1.3 Utilisation des microbilles dans le domaine du diagnostic des allergies	23
1.3.1 Particules magnétiques comme support solide	23
1.3.2 Particules polystyrènes comme support solide.....	26
1.3.3 Test d'agglutination de particules	31
1.4 Projet de diagnostic d'allergie par technologie microbilles développé au LTM.....	35
1.4.1 Préparation des extraits d'allergènes et biofonctionnalisation des microbilles	35
1.4.2 Incubation des microbilles PS avec le sérum de patient et tri magnétique.....	36
1.4.3 Assemblage des microbilles sur une surface microstructuré.....	36
1.5 Conclusion.....	37
Chapitre 2 : Biofonctionnalisation de microbilles	38
2.1 Introduction.....	40
2.1.1 Les microbilles	40
2.1.2 Les ligands (allergènes et anticorps)	40
2.1.3 Complexe de microbilles	42
2.2 Biofonctionnalisation	43
2.2.1 Biofonctionnalisation des microbilles polystyrènes.....	43
2.2.2 Biofonctionnalisation des microbilles superparamagnétiques.....	46
2.2.3 Dispositif expérimental	47
2.3 Caractérisation de la biofonctionnalisation	49
2.3.1 Microbilles polystyrènes.....	49
2.3.2 Microbilles magnétiques	55
2.4 Conclusion	56
Chapitre 3 : Développement d'une technologie de tri magnétique appliqué aux microbilles	58
3.1 Introduction au magnétisme	60
3.1.1 Les différentes catégories de matériaux magnétiques.....	60
3.1.2 Le superparamagnétisme	62
3.1.3 Les microbilles superparamagnétiques.....	63
3.2 Principe théorique	65

3.2.1	Magnétophorèse et force magnétique	65
3.2.2	Séparation magnétique	66
3.3	Mise en place du dispositif expérimental	69
3.3.1	Les séparateurs magnétique	69
3.3.2	Mesure de la vitesse magnétophorétique et de la force magnétique des microbilles SPM	70
3.3.3	Mise en évidence du phénomène d'agglomération des microbilles SPM	72
3.3.4	Protocole détaillé du tri magnétique	73
3.4	Performances du tri magnétique	76
3.4.1	Influence de la taille des microbilles	76
3.4.2	Influence de la quantité des microbilles	77
3.4.3	Influence du temps de réaction	79
3.4.4	Evolution du tri magnétique en fonction de la concentration d'anticorps primaires...	79
3.5	Conclusion	82

Chapitre 4 : Développement d'une technologie d'assemblage gravitationnelle de microbilles en 4 étapes ultra-rapides pour le comptage de particules..... 83

4.1	Méthode d'assemblage de microbilles sur une surface structurée.....	85
4.1.1	Phénomènes physiques mis en jeu lors de l'évaporation	85
4.1.2	Assemblage de particules uniques sans évaporation.....	88
4.1.3	Assemblage par évaporation naturelle	89
4.1.4	Assemblage par évaporation contrôlée	91
4.2	Observation de l'assemblage thermodynamique de microbilles	93
4.2.1	Montage expérimental.....	93
4.2.2	Observations et résultats	94
4.3	Développement de la technologie d'assemblage gravitationnel en 4 étapes	97
4.3.1	Etape 1 : dissolution des bulles d'air	98
4.3.2	Etape 2 : sédimentation	99
4.3.3	Etape 3 : piégeage thermique	100
4.3.4	Etape 4 : Balayage capillaire.....	100
4.4	Dispositif expérimental	102
4.4.1	Description du dispositif expérimental	102
4.4.2	Fabrication de la cellule microfluidique	103
4.5	Etude des points de fonctionnement	106
4.5.1	Etape 1.....	106
4.5.2	Etape 2.....	107
4.5.3	Etape 3.....	108
4.5.4	Etape 4.....	109
4.6	Performances de la technologie d'assemblage gravitationnel.....	110
4.6.1	Etude de l'influence de la concentration de microbilles sur le taux d'assemblage	111
4.6.2	Réalisation d'assemblages successifs.....	112
4.7	Conclusion	115

Chapitre 5 : Utilisation de la technologie microbilles pour la détection d'anticorps spécifiques IgE

5.1	Préparation des analyses du sérum de patient.....	117
5.1.1	Analyse qualitative des sérums sensibles à l'arachide.....	117
5.1.2	Analyse quantitative des sérums de patient par technologie ImmunoCAP®.....	120

5.2	Détection des anticorps IgE sériques par la méthode microbilles.....	121
5.2.1	Description de la méthode	121
5.2.2	Lecture des résultats par assemblage gravitationnel.....	122
5.2.3	Lecture rapide des résultats par spectroscopie	126
5.3	Conclusion.....	129
	Conclusion et perspectives.....	131
	Bibliographie	135

Abréviations, sigles et acronymes

IgE / IgG : Immunoglobuline E / Immunoglobuline G
 PS : PolyStyrène
 SPM : SuperParaMagnétique
 LTM : Laboratoire des Technologies de la Microélectronique
 OMS : Organisation Mondial de la Santé
 AAFA : Fondation Américaine pour l'Asthme et les Allergies
 RAST : RadioAllergoSorbent Test
 RIA : Radio ImmunoAssay
 ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
 CLIA : ChimiLuminescence ImmunoAssay
 FEIA : Fluorescent Enzyme ImmunoAssay
 POC : Point-Of-Care
 PE : PhycoErythrine
 BSA : Bovine Serum Albumin
 FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
 PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
 IUIS : International Union of Immunological Societies
Ara h : Arachis Hypogaea
Cor a : Corylus avellana
Cra c : Crangon
 EDC : 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
 Sulfo-NHS : N-hydroxysulfosuccinimide
 Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
 Tampon TBN : Tampon Tris – BSA – Azoture de sodium
 PBS : Phosphate Buffered Saline
 MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
 BCA : BiCinchoninic acid Assay
 HGMS : High Gradient Magnetic Separation
 LGMS : Low Gradient Magnetic Separation
 NdFeB : Néodyme Fer Bore
 SiO₂ : Silice
 Au : Or
 DRIE : Deep Reactive Ion Etching
 MEB : Microscopie Electronique à Balayage
 SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 CMOS : Complementary Metal Oxide Semi-conductor

Introduction générale

Les microparticules suscitent de plus en plus d'intérêt dans de multiples domaines tels que les matériaux composites, les peintures, les revêtements, les recherches d'hydrocarbures, les matériaux adhésifs, les produits cosmétiques et les produits d'hygiène. Les avancées technologiques ont permis d'améliorer la synthèse des microbilles en contrôlant leurs propriétés physicochimiques. Le domaine biomédical s'est également beaucoup intéressé à ces microbilles pour diverses applications telles que : la bioséparation de protéines, la séparation cellulaire, la diffusion de médicaments *in-situ*, l'imagerie médicale en médecine nucléaire et les diagnostics par immunodosage.

De récentes études se sont portées sur l'utilisation des microbilles pour le diagnostic biomédical à partir d'un échantillon de sérum de patient issu d'un prélèvement sanguin. Ces récents travaux de recherche ont démontré que les microbilles permettent de diminuer le volume de sérum utilisé, la quantité de réactifs, le temps de réaction et permettent d'augmenter la limite de détection par rapport aux techniques d'analyse actuellement utilisées dans les laboratoires d'analyses médicales.

Ces avancées technologiques sont particulièrement propices au diagnostic des allergies, car la quantité d'anticorps à détecter est très faible (0.24 – 240 ng/ml). Les allergies présentent un enjeu sociétal important, touchant 25 % de la population et entraînent une diminution de la qualité de vie. Les symptômes allergiques sont variés et d'intensité différente allant même jusqu'à des réactions aiguës et généralisées menant au choc anaphylactique. Le diagnostic doit être efficace pour conseiller au mieux le patient et diminuer les effets indésirables de cette maladie chronique.

Actuellement, deux outils de diagnostic sont utilisés, d'une part les tests de provocation *in-vivo* effectués sur la peau à partir de gouttes de solution allergénique et d'autre part l'analyse *in-vitro* d'échantillon de sérum de patient dans l'objectif d'évaluer la concentration des anticorps IgE (ImmunoGlobuline E). Cette classe d'anticorps déclenche des réactions immunitaires lorsqu'ils reconnaissent une substance allergénique à laquelle ils ont été sensibilisés lors d'une première étape dite de « sensibilisation ». La concentration de ces anticorps est un bon indicateur du niveau d'intensité de l'allergie. Depuis 20 ans, de nombreuses idées ont abouti à des techniques de diagnostic des allergies en utilisant des particules de taille nano et/ou micrométriques présentant des performances supérieures aux techniques conventionnelles. Parmi ces méthodes, on retrouve des technologies qui utilisent les particules comme support solide : particules PS (PolyStyrènes) ou SPM (SuperParaMagnétiques). L'utilisation de nano-microbilles SPM autorise une manipulation simple et efficace ainsi que leur agglutination pour former des spots de microbilles et réaliser une mesure de fluorescence optimale.

L'objectif de ces travaux de thèse est de décrire une approche basée sur l'utilisation de microbilles PS et SPM pour la détection d'anticorps IgE contenus dans le sérum de patient. Les technologies utilisées ont été développées et optimisées pour démontrer la faisabilité de cette méthode avec une application dirigée vers le diagnostic d'allergies. Cette approche est composée de 4 étapes. Tout d'abord, les microbilles sont recouvertes d'allergènes et les microbilles SPM d'anticorps anti-IgE par des procédés de bio-fonctionnalisation provenant de l'état de l'art. Puis les microbilles PS réagissent avec les sérums de patient d'une part et les microbilles SPM d'autre part. Dans un troisième temps, les microbilles PS ayant réagi avec le

sérum de patient sont isolées au moyen d'un tri magnétique de microbilles. Finalement, ces microbilles sont assemblées sur une surface pour faciliter leur comptage.

L'originalité de l'approche que nous proposons dans cette thèse est la combinaison de 3 technologies : la bio-fonctionnalisation de surface, le tri magnétique appliqué aux microbilles et l'assemblage gravitationnel de microbilles. L'idée est d'utiliser des microbilles PS pigmentées pour un encodage colorimétriques permettant de discriminer les allergènes fixés à la surface de la microbille. Un mélange de ces différentes microbilles permet de tester une multitude d'allergènes en une seule fois par multiplexage.

Le chapitre 1 introduit de façon générale les connaissances nécessaires sur les allergies pour comprendre les objectifs du diagnostic d'allergies. Les différentes méthodes sont décrites en présentant les avantages et inconvénients de chacune d'entre-elles. Puis, les différents travaux de recherche sur le diagnostic des allergies basés sur l'utilisation de nano et/ou microparticules sont étudiés.

Le chapitre 2 présente la technologie de bio-fonctionnalisation des microbilles polystyrènes d'une part et des microbilles SPM d'autre part. Cette technologie permet de greffer des protéines à la surface des microbilles. Les microbilles PS sont fonctionnalisées avec des allergènes alors que les microbilles SPM sont fonctionnalisées avec des anticorps secondaires anti-IgE. Différentes techniques de caractérisation sont utilisées pour mettre en évidence le greffage des protéines d'intérêt et pour évaluer la quantité de protéines par unité de surface. Le dispositif et les protocoles expérimentaux sont détaillés.

Le chapitre 3 s'intéresse à la technologie de tri magnétique appliquées aux microbilles PS. Cette technologie, très utilisée pour la séparation des cellules par discrimination de marqueurs biologiques de surface, a été adaptée pour une application sur des microbilles. Le tri magnétique est utilisé pour séparer les microbilles ayant réagi avec le sérum de patient des microbilles restées neutres. Les concepts fondamentaux de magnétisme et de superparamagnétisme sont présentés.

Le chapitre 4 montre le développement d'une nouvelle méthode d'assemblage de microbilles uniques en exploitant la force de gravitation. Le principe physique de chaque étape et leur caractérisation sont présentés. Le dispositif élaboré et le protocole expérimental y sont dévoilés. Les performances de cette technologie sont comparées aux autres techniques.

Le chapitre 5 utilise les technologies développées dans les chapitres 2, 3 et 4 pour permettre la détection des anticorps IgE en analysant des échantillons de sérum de patient allergique aux extraits d'arachide, de noisette ou de crevette. La préparation et les analyses de contrôle des échantillons sont réalisées. Des tests cliniques pour une mesure qualitative sont également exposés et une comparaison est effectuée avec les valeurs obtenues par la technologie ImmunoCAP®.

Chapitre 1 : Etat de l'art

1.1	Comprendre les allergies.....	15
1.1.1	Un enjeu sociétal fort	15
1.1.2	Les allergènes	15
1.1.3	L'allergie IgE reliée.....	16
1.2	Diagnostics des allergies	17
1.2.1	Test <i>in-vivo</i> de provocation sur la peau : test de Prick.....	17
1.2.2	Test <i>in-vitro</i> : principe de l'immunodosage en « sandwich ».....	18
1.2.3	Les outils de diagnostics d'allergies <i>in-vitro</i> commercialisées	19
1.3	Utilisation des microbilles dans le domaine du diagnostic des allergies	23
1.3.1	Particules magnétiques comme support solide	23
1.3.2	Particules polystyrènes comme support solide.....	26
1.3.3	Test d'agglutination de particules	31
1.4	Projet de diagnostic d'allergie par technologie microbilles développé au LTM.....	35
1.4.1	Préparation des extraits d'allergènes et biofonctionnalisation des microbilles	35
1.4.2	Incubation des microbilles PS avec le sérum de patient et tri magnétique.....	36
1.4.3	Assemblage des microbilles sur une surface microstructuré.....	36
1.5	Conclusion.....	37

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au principe de fonctionnement des allergies du point de vue du système immunitaire et en particulier : le rôle clé des anticorps IgE dans le déclenchement des réactions allergiques. Les différentes techniques utilisées dans les laboratoires d'analyses médicales pour le diagnostic de l'allergie seront présentées. Les performances, les avantages ainsi que les inconvénients de chaque méthode seront exposés. Puis, l'état de l'art des techniques du diagnostic des allergies par l'utilisation de nano-microbilles sera abordé. Nous présenterons, dans une dernière partie, le projet recherche constituant ce travail de thèse portant sur le diagnostic des allergies basé sur la technologie microbilles mise en place au sein du laboratoire LTM.

1.1 Comprendre les allergies

1.1.1 Un enjeu sociétal fort

La société moderne est soumise aux contraintes environnementales dues à la présence de polluants dans l'air, l'eau et le sol responsables en partie de l'augmentation préoccupante des symptômes allergiques au sein de la population. En effet, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) classe les maladies allergiques au quatrième rang parmi les maladies chroniques, touchant près de 30 % de la population des pays occidentaux¹. Un nombre qui a doublé en 20 ans notamment chez les enfants et les adolescents, par exemple l'allergie au lait de vache touche 10 % des enfants^{2,3}. L'OMS estime qu'une personne sur deux en sera affectée d'ici 2050. La figure 1.1a est un graphique de l'AAFA (Fondation Américaine pour l'Asthme et les Allergies) qui montre que le nombre de personnes touchées par les allergies est plus élevé que pour d'autres maladies comme le cancer et le diabète. De plus, le nombre de réactions allergiques sévères comme les chocs anaphylactiques est également en constante augmentation. C'est une réaction rapide, violente et potentiellement mortelle s'il n'y a pas une intervention médicale rapide. Le graphique de la figure 1.1b illustre cette augmentation en comparant le nombre d'admissions pour chocs anaphylactiques chez toutes les tranches d'âge en Australie⁴. En particulier, le graphique montre que le nombre de cas de chocs anaphylactiques traités a été multiplié par 4 (40 à 190) chez la tranche d'âge des moins de 4 ans entre 1994 et 2004.

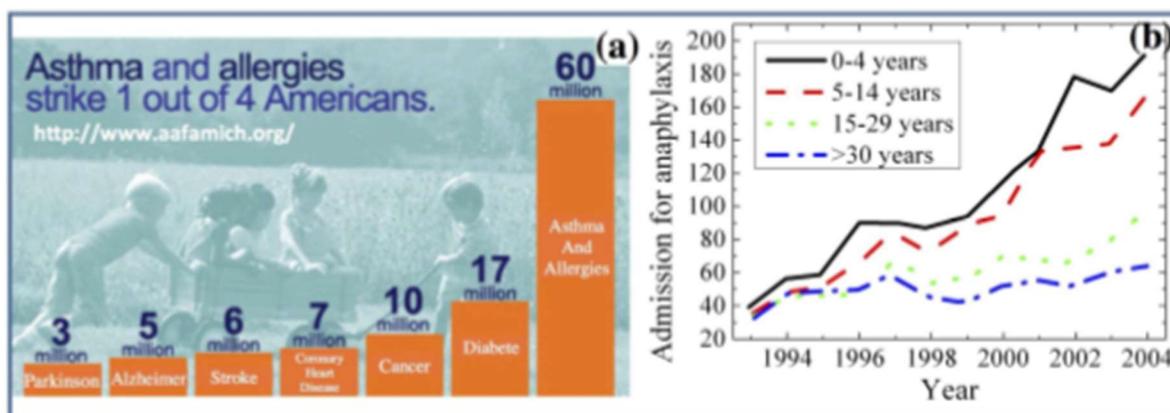


Figure 1.1 : a) Principales maladies affectant la population aux Etats UNIS, b) statistique des réactions anaphylactiques en Australie en fonction des différentes tranches d'âges⁴.

1.1.2 Les allergènes

La plupart des allergies peuvent être déclenchées par un grand nombre de protéines appelées : les allergènes. Ils proviennent de sources très variées (pollen, acariens, moisissures, insecte, nourritures et médicaments) comme l'indique de diagramme circulaire de la figure 1.2. Par ailleurs, de nouveaux allergènes sont régulièrement découverts. Depuis 2004, 200 nouveaux allergènes sont identifiés chaque année en moyenne. Actuellement, 3 164 molécules⁵ ont été reconnues comme potentiellement allergéniques. Certains ne sont pas présents sous forme de protéines, mais de petites molécules comme la pénicilline ou le nickel. Cependant, ils

déclenchent des symptômes allergiques par le même mécanisme, car ils ont la capacité de se lier avec une petite molécule appelée haptène.

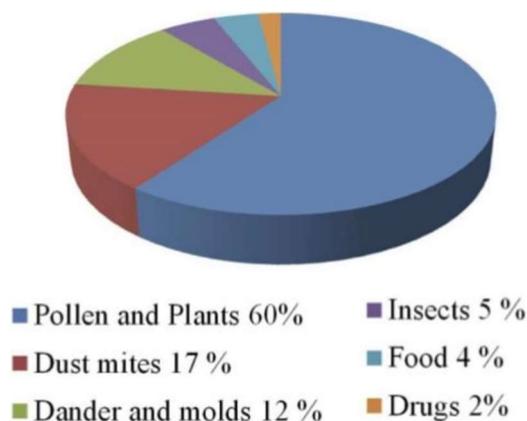


Figure 1.2 : Diversité des sources allergéniques.

1.1.3 L'allergie IgE reliée

Le système immunitaire a pour fonction de nous protéger contre les micro-organismes (bactéries, virus et parasites), les substances chimiques et le cancer. Ce système de défense est composé d'un grand nombre de cellules différentes et de protéines. Cet ensemble a deux rôles : dépister les microorganismes qui constituent une menace et les détruire à cause de leur nocivité. Il arrive malheureusement parfois, que le système immunitaire réagisse de manière excessive à des substances provenant du milieu extérieur et normalement inoffensives : les allergènes. Le mécanisme de réaction allergique se déroule en deux phases⁶ :

- La sensibilisation (premier contact)
- La réaction allergique (contact ultérieur)

Lors de la phase de sensibilisation, après avoir détecté un allergène, le système immunitaire se met à fabriquer en très grandes quantités des anticorps. Appelés immunoglobuline E (IgE)⁷⁻¹⁰, ce type d'anticorps peut se fixer sur des cellules spéciales : mastocytes et basophiles qui contiennent des granules toxiques.

Durant la seconde phase, l'allergène est directement reconnu par les anticorps IgE. L'allergène se fixe sur les IgE présents à la surface des mastocytes provoquant la libération des granules toxiques. Elles contiennent de puissants irritants chimiques tels que l'histamine¹⁰. La figure 1.3 montre le principe de déclenchement des allergies causé par la liaison entre un mastocyte, des anticorps IgE et des allergènes.

Plus la concentration d'IgE est importante, plus les symptômes seront importants¹¹. Les anticorps IgE sont dits spécifiques, ils reconnaissent un allergène précis. Par conséquent, il existe autant d'anticorps IgE différents que d'allergènes. Cependant, il est possible qu'un anticorps IgE reconnaisse et déclenche une réaction allergique pour un autre allergène différent de celui pour lequel il a été fabriqué, c'est le cas des allergies croisées¹².

Un diagnostic d'allergies idéal doit permettre au patient de connaître sa réaction (allergies ou non) pour chaque allergène¹³. Nous verrons dans la prochaine partie les différents outils de diagnostics mis à disposition pour les professionnels de la santé et les particuliers.

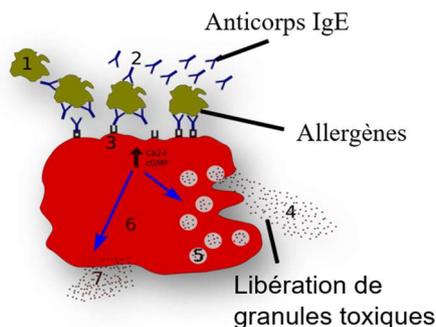


Figure 1.3 : Mécanisme de réaction de reconnaissance l'allergène par le système immunitaire et provocation des symptômes allergiques.

Les allergies présentent un enjeu sociétal majeur avec un nombre de personnes affectées et des réactions aiguës en constante augmentation.

Les sources allergéniques capables de déclencher ces réactions allergiques sont très diversifiées, plus de 3 000 protéines ont été identifiées comme potentiellement allergiques.

Nous avons mis en évidence que les anticorps IgE jouent un rôle primordial dans le déclenchement des réactions allergiques qui se déclenchent en deux étapes : une phase de sensibilisation et une phase de réaction. Il y a un lien entre concentration des IgE présent dans le système immunitaire et intensité des réactions allergiques.

1.2 Diagnostics des allergies

Actuellement, on peut regrouper les technologies de diagnostics d'allergies en deux grandes catégories. Les tests de provocation sur la peau (*in-vivo*) et les tests d'analyse du sérum de patient (*in-vitro*) pour quantifier la concentration d'anticorps IgE.

1.2.1 Test *in-vivo* de provocation sur la peau : test de Prick

Les tests *in-vivo* effectués sur la peau dans le cadre d'un dépistage d'allergies ont été décrits pour la première fois en 1867. Le test de Prick¹⁴ est le plus répandu par sa simplicité de mise en place et d'interprétation des résultats. Il consiste à piquer et déposer à travers l'épiderme une goutte de solution allergénique sur la face antérieure de l'avant-bras ou le dos (figure 1.4a et 1.4b). C'est un test faiblement invasif et assez reproductible s'il est correctement effectué. Les résultats sont obtenus en 15 minutes. Un test positif se manifeste par une papule (un petit bouton ressemblant à une pique d'orties) ayant un diamètre supérieur à 3 mm. Cependant, cette méthode présente des inconvénients majeurs. Ces tests ne peuvent pas être réalisés sur les patients souffrant d'eczéma aiguë ou ayant un traitement antihistaminique. De plus, chez certains patients à risque, une réaction généralisée conduisant à un choc anaphylactique peut se produire^{15,16}.

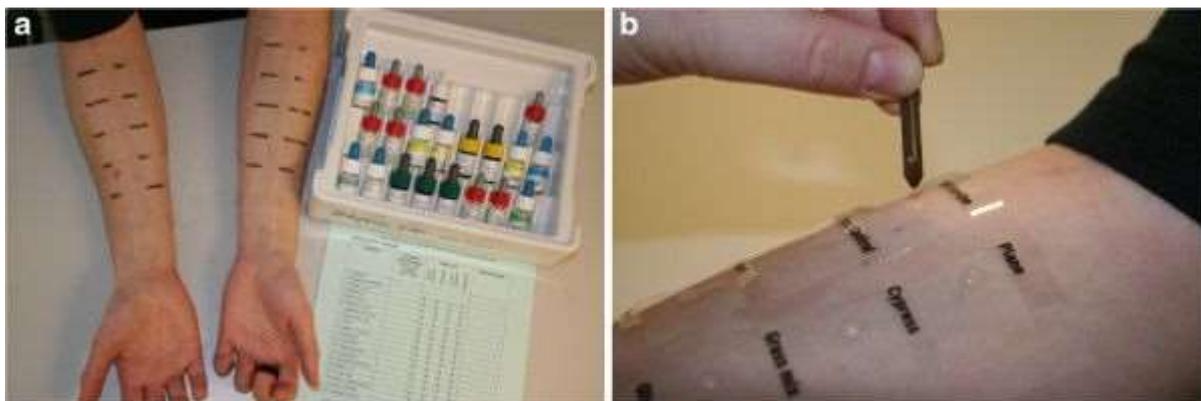


Figure 1.4 : Test de Prick effectué sur la peau du patient en utilisant différentes sources allergéniques.

1.2.2 Test *in-vitro* : principe de l'immunodosage en « sandwich »

Les réactions allergiques résultent d'une concentration anormalement élevée d'une catégorie d'anticorps : les immunoglobulines E. Notre système immunitaire produit des anticorps regroupés en 5 classes : IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Les IgE rentrent dans la catégorie d'anticorps dont la concentration totale dans un échantillon de sérum de patient non-allergique est comprise entre 1.5kU/l et 144 kU/l (3.6 ng/ml et 345.6 ng/ml)¹⁷. L'unité de concentration utilisée kU/l ou UI/ml correspond à 2.4 ng/ml. Le seuil de concentration des IgE spécifiques est fixé à 0.1UI/ml soit 0.24ng/ml. Si la concentration mesurée est supérieure à cette valeur, le test est dit positif à l'allergène correspondant à l'anticorps spécifique testé. Ainsi, la quantité d'anticorps à détecter pour effectuer un diagnostic d'allergies est très faible. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des méthodes de diagnostic très sensibles dans le cas des allergies.

Dans le but de surmonter les inconvénients du test *in vivo*, les tests d'immunodosage de type « sandwich » ont été étudiés, développés puis utilisés. Tout d'abord les allergènes ou l'extrait d'allergènes est immobilisé sur une phase solide. Puis, le sérum de patient y est incubé permettant aux anticorps IgE de se fixer sur les allergènes. Une solution de révélation contenant des anticorps secondaires anti-IgE ciblant les IgE spécifiques est ajoutée. Le signal est détecté grâce au marquage de l'anticorps secondaire qui diffère selon la technologie utilisée. En 1967, le test RAST¹⁸ (RadioAllergoSorbent Test) a été développé en se basant sur la méthode RIA (radio-immunoassay) : c'est une technique de dosage semi-quantitative (6 niveaux) des IgE spécifiques. Les anticorps anti-IgE possèdent un marquage radioactif permettant d'évaluer la concentration d'IgE en mesurant un nombre de désintégrations par seconde. Ce test original a été remplacé par des dosages immunoenzymatiques. Dans ce cas, l'anticorps secondaire est marqué avec des enzymes (figure 1.5). La technique ELISA¹⁹ (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilise des anticorps secondaires marqués à un enzyme qui colore la solution. Le signal est mis en évidence par mesure de l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée. L'absorbance est proportionnelle à la concentration d'anticorps. Une autre méthode utilisée pour la révélation est la chimiluminescence CLIA^{20,21} (ChimiLuminescence ImmunoAssay). L'anticorps est marqué par une molécule luminescente qui émet dans le visible ou dans le proche ultra-violet (300 nm – 800 nm), cette émission résulte de la transition d'un électron d'un état excité à un état fondamental. Cette méthode présente l'avantage de réaliser des mesures absolues alors qu'elles sont relatives dans le cas de l'absorbance. La technologie FEIA²² (Fluorescent Enzyme ImmunoAssay) a été développée pour la détection et la

quantification des anticorps IgE. Dans ce cas, l'anticorps secondaire est couplé à une enzyme fluorogène FEIA, ainsi la solution devient fluorescente en présence de l'enzyme. Le signal est analysé par mesure de la fluorescence à l'aide d'un spectrophotomètre. La technologie FEIA, plus récente, permet d'obtenir un signal plus fort et une meilleure limite de détection qu'avec la technologie ELISA ou CLIA.

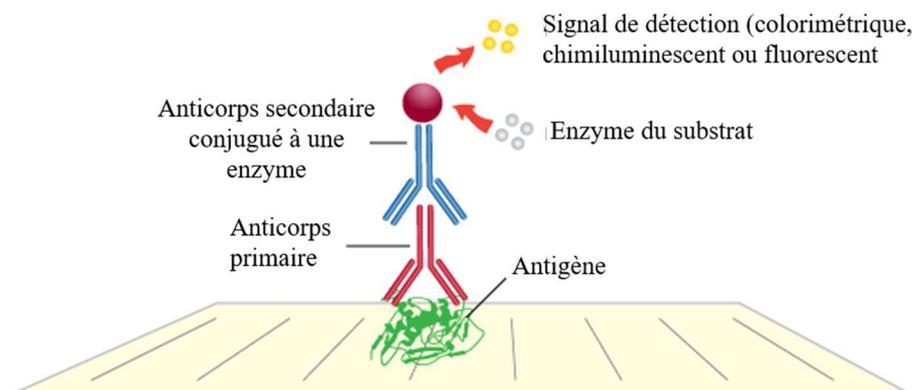


Figure 1.5 : Principe de détection des anticorps primaires par immunodosage de type « sandwich ».

1.2.3 Les outils de diagnostics d'allergies *in-vitro* commercialisés

Dans cette partie, nous allons présenter 3 outils de diagnostics commercialisés par PHADIA²³⁻²⁴ : un banc de test automatisé²⁵ (ImmunoCAP®), une biopuce²⁶ pour des tests multiplexes (ImmunoCAP® ISAC) et un test point-of-care²⁷ (ImmunoCAP® point-of-care Rapid).

1.2.3.1 Les tests automatisés

Actuellement, il existe 3 systèmes de diagnostics d'allergies automatisés provenant de 3 sociétés différentes exploitant des technologies différentes²⁸. HYTEC a développé le système HYTEC™-288 (figure 1.6a) basé sur la méthode ELISA, PHADIA commercialise le système ImmunoCAP® (figure 1.6b) par méthode FEIA et Siemens utilise le système Immulite® basé sur la chimiluminescence (figure 1.6c). Ces trois systèmes sont automatisés et permettent d'analyser un grand nombre de sérums dans un laboratoire d'analyses médicales en une journée. Ces systèmes sont capables de mesurer des concentrations d'anticorps IgE comprises entre 0.1 UI/ml et 100 UI/ml (0.24 ng/ml -240 ng/ml). Par exemple, le système ImmunoCAP® a une capacité d'analyse compris entre 16 et 240 tests par heure en fonction du modèle. La durée d'analyse pour un test est de 2 h 30. Les échantillons d'allergènes, de solution tampon et de sérums de patient sont introduits dans le dispositif et les tests sont effectués à la chaîne permettant de produire un grand nombre de résultats d'analyses en une journée.



Figure 1.6 : Photo des systèmes commercialisés et automatisés pour le diagnostic d'allergies provenant de différentes entreprises²⁸ : **a)** HYCOR, **b)** Phadia et **c)** Siemens.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au système ImmunoCAP® commercialisées par PHADIA utilisé par notre partenaire du laboratoire d'immunologie situé au centre hospitalier de Lyon sud. La phase solide d'ImmunoCAP® est constituée d'un dérivé cellulosique enfermé dans une capsule. Ce polymère hydrophile, fortement ramifié, fournit un milieu qui favorise leur fixation tout en préservant leur structure native. L'allergène est conjugué de manière covalente à la phase solide et réagit avec les IgE spécifiques du sérum de patient. Un lavage est effectué pour retirer le sérum puis les anticorps anti-IgE marqués par un enzyme fluorophore sont ajoutés pour former un complexe (allergène – anticorps IgE – anticorps anti-IgE). Après incubation, les anti-IgE non liés sont éliminés par une étape de lavage et le complexe formé est alors incubé avec une solution de développement qui révèle l'enzyme fluorophore. Après avoir arrêté la réaction, la fluorescence de la solution est mesurée. La fluorescence est directement proportionnelle à la concentration d'IgE spécifiques de l'échantillon. Cette technique est rapide (2 h 30), reproductible, mais laisse peu de flexibilité. En effet, seulement 650 allergènes provenant de 90 sources allergéniques sont mis à disposition par le fabricant. De cette manière, il n'est pas possible d'effectuer des tests avec d'autres allergènes pour un diagnostic personnalisé pour chaque patient.

1.2.3.2 Les biopuces en multiplexe

Un test d'immunodosage en multiplexe permet de tester plusieurs antigènes en un seul test. Il existe de différents tests multiplexes pour le diagnostic d'allergies afin de tester plusieurs allergènes simultanément. Dans cette partie, nous présentons le test ImmunoCAP® ISAC^{26,29}. C'est une plateforme miniaturisée d'immunodosages, basée sur la technologie FEIA, dans laquelle les différents allergènes sont immobilisés sur un microréseau. Cette technologie avancée permet de mesurer la concentration d'IgE spécifiques vis à vis d'un panel fixe de 112 allergènes qui couvre 51 sources allergéniques. Le test est réalisé dans un laboratoire d'analyses médicales, à partir de 30 µl de sérum de patient. ImmunoCAP® ISAC est le premier outil de diagnostic in vitro de type multiplexe destiné aux spécialistes de l'allergie. Cet outil permet de dépister plusieurs allergies à partir d'un seul échantillon de sérum de patient.

La figure 1.7 montre l'utilisation de la biopuce. Tout d'abord, un prélèvement sanguin est effectué (figure 1.7a), l'échantillon du sérum de patient issu du prélèvement est déposé sur le microréseau contenant les différents allergènes (figure 1.7b). Puis la biopuce est scannée à

l'aide d'un laser pour mesurer l'intensité de fluorescence sur chaque spot d'allergène (figure 1.7c). Finalement, une image représentant l'intensité de fluorescence de chaque spot d'allergène est fournie (figure 1.7d). Les spots sont regroupés par trois sur une zone où l'allergène est le même afin d'effectuer une moyenne statistique. Le microréseau est composé de spots mesurant 200 μm de diamètre et contenant chacun 100 pg d'allergènes. Ils sont répartis sur une aire de 49 mm^2 qui constitue le site réactionnel. Comme indiquée sur la figure, une lame comporte 4 sites réactionnels et permet une analyse pour 4 patients différents. Une goutte de sérum de patient (30 μl) est déposée sur le site réactionnel, puis après lavage, l'anticorps secondaire conjugué à un enzyme est ajouté pour permettre une mesure de fluorescence et évaluer une concentration en anticorps spécifique IgE. A l'inverse du banc automatisé ImmunoCAP® où la phase solide est contenue dans une capsule avec un seul allergène, la biopuce ISAC²⁶ est recouverte de 112 allergènes répartis en réseau à sa surface.

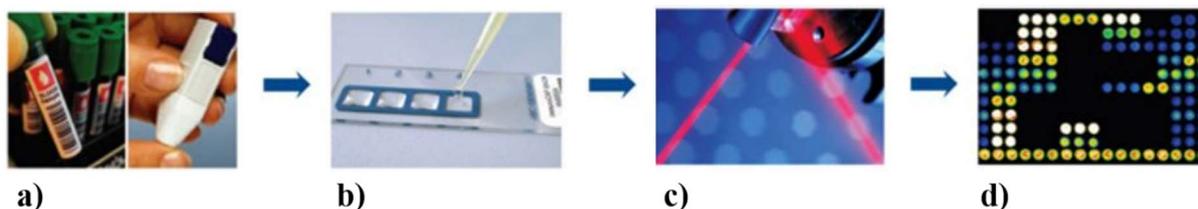


Figure 1.7 : Procédé de dépistage multiplexe des allergies ImmunoCAP® ISAC : a) Prélèvement sanguin, b) dépôt du sérum de patient sur la biopuce contenant les allergènes, c) examen de la biopuce par laser et d) analyse des résultats en fonction de l'intensité des différents spots²⁶.

1.2.3.3 ImmunoCAP® point-of-care Rapid

De plus en plus de recherches biomédicales, s'intéressent au diagnostic POC (Point-Of-Care). C'est un test destiné à être effectué à proximité directe du patient ; les résultats sont obtenus rapidement (15 à 60 minutes). Ces tests sont conçus pour être effectués par du personnel non nécessairement formé en médecine de laboratoire (infirmière, aide médicale), voire par le patient lui-même ou ses proches. L'émergence des puces microfluidiques réalisées à l'aide des technologies de la microélectronique a permis de créer des dispositifs miniaturisés permettant de rendre ces tests rapides, simples d'utilisation et performants. Plusieurs systèmes spécialement conçus pour la détection des anticorps IgE (spécifiques ou totaux) existent.

ImmunoCAP® rapid²⁷ est un de ces dispositifs hors laboratoire miniaturisés et multiplexes. Il est destiné au diagnostic simultané de 10 allergies afin d'évaluer les patients développant des symptômes allergiques par agglutination de nanoparticules d'or. Il contient 10 allergènes et les résultats du test sont qualitatifs. Le test est positif lorsqu'une bande de couleur apparaît pour un allergène donné. Il est simple d'utilisation, une goutte de sang est déposée à l'endroit prévu (figure 1.8a et figure 1.8b), les anticorps IgE vont se fixer sur des bandes contenant les allergènes. Après un certain temps, il est déposée une solution de développement (figure 1.8c) contenant des nanoparticules d'or recouvertes d'anticorps secondaires anti-IgE. Ils vont s'agglutiner sur les anticorps spécifiques IgE qui se sont eux-mêmes fixés sur les allergènes de la bande. Cette agglutination des nanoparticules provoque une coloration de la bande visible à l'œil nu montré sur la figure 1.8d, et révèle la présence d'anticorps IgE spécifiques correspondant aux allergènes de la bande. Le temps total de réaction est de 20 minutes.

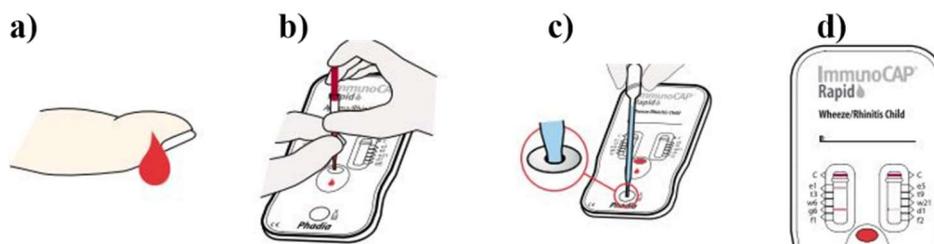


Figure 1.8 : Diagnostic point-of-care ImmunoCAP Rapid en 4 étapes : **a)** prélèvement d'une goutte de sang, **b)** dépôt de la goutte de sang, **c)** injection d'une solution de développement contenant des nanobilles d'or conjuguées anti-IgE et **d)** lecture des résultats¹⁰⁹.

L'inconvénient majeur de cette technique est le manque de flexibilité. En effet, la quantité et la nature des allergènes sont imposées. Ce test ne permet pas d'évaluer de nouveaux allergènes pour s'adapter à l'historique allergologique du patient. De plus en plus d'études se concentrent sur la diminution des temps de procédé et des volumes des sérums de patient nécessaire. Des techniques émergentes à base de nano-microparticules sont étudiées et développées au sein de la communauté scientifique.

<i>Technologie</i>	<i>Nombre d'allergies dépistées</i>	<i>Temps de réaction</i>
ImmunoCAP®	1 (singleplex)	2h30
ImmunoCAP® ISAC	112 (multiplex)	3h10
ImmunoCAP® P-O-C Rapid	10 (multiplex)	20 min

Tableau 1.1 : Performances des différentes technologies ImmunoCAP®

Deux types de diagnostics d'allergies ont été présentés : les diagnostics in-vivo et in-vitro.

Le test de Prick consiste à injecter dans l'épiderme des gouttes de solutions allergéniques, les réactions locales sur la peau sont analysées. Les résultats sont obtenus rapidement en 15 minutes et sont simples d'interprétation. Ce test est effectué chez un allergologue, mais ne peut pas être effectué sur les patients à risque.

Les technologies d'immunodosage utilisées pour le diagnostic in-vitro ont été présentées. La révélation de l'anticorps primaire présent dans le sérum de patient est effectuée par le marquage de l'anticorps secondaire soit par un composant radioiodé, soit par un enzyme (détection colorimétrique ELISA ou fluorescente FEIA) soit par une molécule détectable par une méthode de chimiluminescence (CLIA).

Dans cette section, nous avons listé les différents outils de diagnostic in-vitro pour les allergies. Trois outils de diagnostic automatisé utilisés dans les laboratoires d'analyses médicales basés sur les technologies CLIA, FEIA et ELISA. Deux autres outils de diagnostics commercialisés par la société PHADIA ont également été présentés. Le premier est une biopuce de type multiplexe pour le dépistage simultané sur 112 allergènes réalisé dans un laboratoire d'analyses médicales. Le deuxième est un système miniaturisé point-of-care très simple d'utilisation permettant le diagnostic rapide sur une dizaine de

sources allergéniques proposées à partir d'une seule goutte de sang pouvant être effectué par le patient lui-même.

1.3 Utilisation des microbilles dans le domaine du diagnostic des allergies

Plusieurs travaux de recherche ont utilisé les microbilles pour le diagnostic des allergies. Les microbilles apportent une diffusion plus importante des protéines fixées à leur surface par rapport aux techniques conventionnelles où la phase solide est immobile. Grâce à ce phénomène de diffusion, les volumes de sérum et de réactif, le temps de réaction et la limite de détection peuvent être diminués par l'utilisation de technologies émergentes à base de microbilles. La concentration des anticorps IgE contenus dans le sérum de patient est évaluée par l'utilisation de microbilles. Nous avons classé ces travaux de recherche en 3 grandes catégories, les techniques utilisant des particules magnétiques comme support d'immunodosage, celles utilisant des particules PS comme support et les tests basés sur le principe d'agglutination de nanobilles.

1.3.1 Particules magnétiques comme support solide

1.3.1.1 Immunodosage par électrophorèse

Chen H.X³⁰ et al ont présenté une méthode pour la quantification des IgE totaux correspondant à la mesure de concentration de tous les IgE contenus dans le sérum de patient. Cette méthode hybride³⁰ combine l'immunocapture, l'électrophorèse capillaire et l'utilisation des microbilles SPM (1.08µm) comme support d'immunodosage afin de mesurer la concentration des anticorps totaux IgE. L'électrophorèse capillaire³¹ a été conçue pour séparer des espèces chimiques selon leur charge et leur taille à l'intérieur d'un petit tube capillaire rempli d'un électrolyte. La réaction a lieu dans un dispositif microfluidique ; la miniaturisation du dispositif présente l'avantage de proposer un procédé rapide (50 min) automatisé et nécessitant un très faible volume de sérum de patient (1µl). La réaction avec le sérum est réalisée dans un canal microfluidique couplé avec un aimant permanent permettant l'agglomération des microbilles magnétiques. Le principe est indiqué sur le schéma de la figure 1.9a. Les anticorps IgE du sérum de patient se fixent d'une part sur les anticorps anti-IgE présents à la surface des microbilles SPM et d'autre part sur un deuxième anticorps anti-IgE marqué avec un fluorochrome. Malgré le flux, les particules SPM sont immobilisées par l'aimant qui génère une force magnétique plus importante que la force hydrodynamique. Les étapes de lavage et de séchage sont réalisées *in-situ* pour retirer le sérum en excès et les protéines indésirables pouvant se lier de manière non-spécifique. Les anticorps secondaires marqués à un fluorochrome sont séparés des nanoparticules par électrophorèse capillaire permettant la détection et la quantification des IgE à l'aide d'un laser. La limite de détection est suffisamment faible pour détecter des concentrations picomolaires. Les résultats sont présentés sur la figure 1.9b. Le graphique présente l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du logarithme de la concentration en IgE. Il a été mis en évidence dans cette étude un signal linéaire dans une gamme de concentration d'IgE de 4 ordres de grandeur entre 2.4 ng/ml et 2400 ng/ml qui est la gamme de détection des anticorps IgE utilisées par les

méthodes conventionnelles. Chen H.X et al³⁰ ont démontré que cette méthode permet d'obtenir des résultats reproductibles et en accord avec les mesures réalisées avec la technologie ImmunoCAP®.

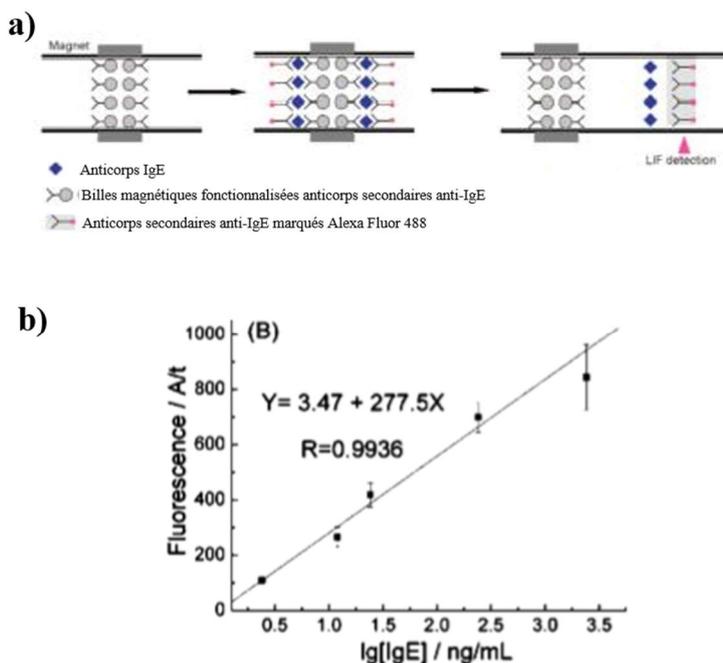


Figure 1.9 : a) Principe de détection des anticorps IgE par électrophorèse capillaire³⁰, b) Signal d'intensité de la fluorescence en fonction de la concentration en anticorps IgE des sérums de patient³⁰.

1.3.1.2 Système microfluidique combinant la technologie ELISA et les microbilles magnétiques

G. Proczek et al³² de l'École Polytechnique fédérale de Lausanne ont présenté un dispositif microfluidique GRAVI™-Cell (figure 1.10a) dédié à la quantification des IgE spécifiques du sérum de patient. Le dispositif permet la calibration et l'analyse sur plusieurs allergènes simultanément par multiplexage grâce à un ensemble de 8 microcanaux et 8 réservoirs (figure 1.10c) disposés parallèlement au sein d'une biopuce. La méthode est basée sur l'exploitation des forces de capillarité et de gravitation. Le dispositif créé combine la technique ELISA avec l'utilisation de microbilles SPM (diamètre de 1 μm) en tant que support d'immunodosage de type « sandwich ». Un mélange contenant les microbilles magnétiques, les anticorps secondaires et le sérum sont injectés et incubés à travers les microcanaux. Puis les microbilles magnétiques sont piégées et immobilisées grâce à des aimants permanents permettant la séparation de la phase solide (microbilles magnétiques) des réactifs en excès (figure 1.10b). Le marquage des anticorps secondaires à l'enzyme *alkaline phosphatase* permet une révélation des IgE par colorimétrie. La manipulation des billes magnétiques à l'aide d'un aimant permet de les préconcentrer et d'augmenter l'intensité du signal fluorescent par rapport à la technique standard ELISA. La calibration et l'analyse de sérum est rapide (moins d'1 h) et nécessite seulement 1.5 μl de sérum de patient. La plateforme est automatisée à l'aide d'un robot dont le rôle est d'apporter une agitation mécanique durant les étapes de réactions. L'étude démontre que l'intensité du signal colorimétrique est proportionnelle à la concentration en IgE du sérum de patient. Les résultats obtenus démontrent une limite de détection égale à 17.5 ng/ml et une linéarité du signal par rapport à la concentration d'IgE (figure 1.10d).

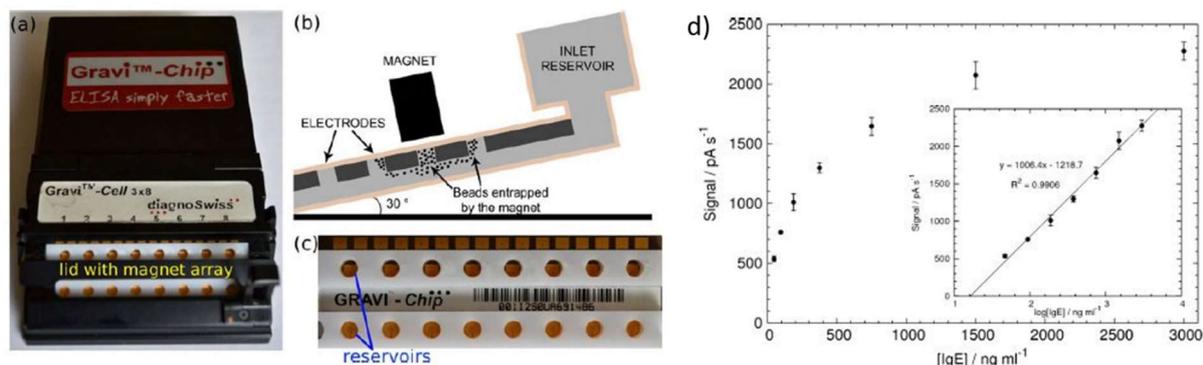


Figure 1.10 : **a)** Dispositif microfluidique Gravi™ -Chip dédié au diagnostic d'allergies³², **b)** Piégeage des microbilles magnétiques à proximité de l'aimant permanent et des électrodes³², **c)** réservoirs³², **d)** évolution de signal en fonction de la concentration en IgE³².

1.3.1.3 Biopuce intégrant des nanoparticules magnétiques

Cette étude, menée par Teste. B et al³³, a été publiée en 2011 et présente le développement d'une biopuce simple d'utilisation dédiée au diagnostic des allergies. Des nanobilles magnétiques sont utilisées comme plateforme d'immunocapture des anticorps IgE placés à l'intérieur d'un microdispositif. L'étude mentionne que la cinétique de capture des anticorps du sérum de patient est 1000 fois plus rapide en phase colloïdale qu'en phase solide classique. Les nanobilles s'agglomèrent sur les parois en contact avec un aimant permanent (figure 1.11a). Cette préconcentration permet d'augmenter la valeur du signal de fluorescence et d'obtenir une forte sensibilité. Le sérum de patient réagit avec les nanobilles permettant aux anticorps spécifiques IgE de se fixer à leur surface. Une solution d'anticorps secondaires fluorescents est ajoutée, le signal de fluorescence dépend de la concentration en anticorps spécifiques présent dans le sérum de patient. Les résultats montrent une différence de signal fluorescent, ce qui permet de discriminer les sérums en fonction de leur concentration en anticorps IgE. Les différentes concentrations sont les suivantes : sérum de contrôle : 0 ng/ml, sérum 1 : 4.5 ng/ml et le sérum 2 : 24 ng/ml (figure 1.11b). Le temps de procédé est court (20 min) et nécessite un volume de sérum faible (5 μ l) avec une limite de détection atteinte égale à 1 ng/ml.

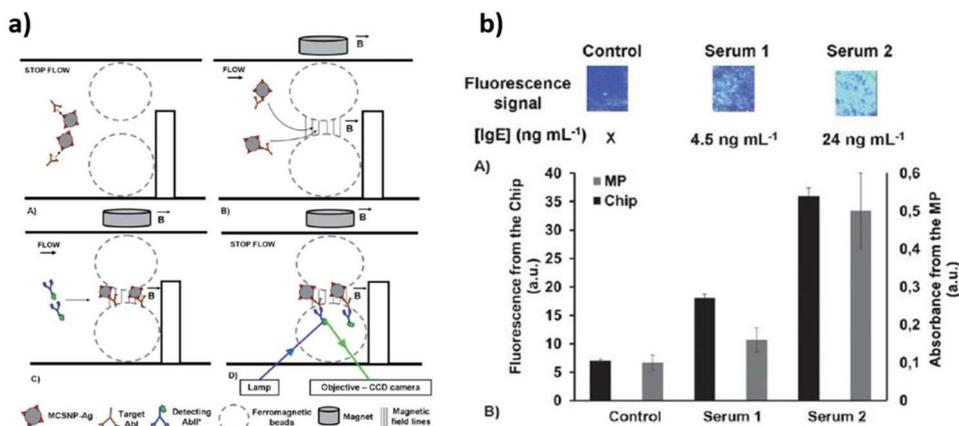


Figure 1.11 : a) Principe d'agglomération des nanoparticules magnétiques dans le système microfluidique³³, b) mesure du signal de fluorescence sur l'échantillon de contrôle et les sérums de patient à concentration différentes en IgE³³.

1.3.2 Particules polystyrènes comme support solide

1.3.2.1 Immunodosage par magnétophorèse

Ki Hahn.Y et al ont publié des travaux de recherche³⁴ mettant en évidence un immunodosage par l'utilisation de la magnétophorèse. Dans cette étude, ils ont montré que la concentration des anticorps spécifiques IgE contenus dans un échantillon de sérum de patient peut être évaluée en mesurant la vitesse de déviation magnétophorétique d'une microbille PS. L'étude montre que la vitesse est proportionnelle au nombre de nanoparticules SPM attachées à sa surface via une liaison anticorps primaire – anticorps secondaires, sous l'action d'un gradient de champ magnétique élevé. Le schéma de principe est montré sur la figure 1.12a. Des microbilles PS de diamètre 5.6 μm sont fonctionnalisées avec deux types d'allergènes d'acariens, puis sont mises en incubation avec le sérum de patient. Après fixation des IgE spécifiques sur les microbilles, l'ensemble est mélangé avec une suspension de nanoparticules magnétiques (9 nm) conjuguées avec des anticorps secondaires anti-IgE. Les nanoparticules magnétiques vont se fixer sur la microbille PS via une interaction anticorps – anticorps. Le tout est placé dans une puce microfluidique contenant une microstructure de nickel qui combiné à un aimant permanent génère localement un gradient de champ magnétique élevé. Les microbilles sont soumises à un flux hydrodynamique à travers un canal microfluidique et présentent une trajectoire de déviation à l'approche du gradient de champ magnétique. Dans cette étude, pour chaque test, la vitesse de déviation a été mesurée sur cinq microbilles. Ils ont montré que la vitesse de déviation magnétophorétique mesurée dépend de la quantité de nanoparticules magnétiques attachées qui est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifique IgE contenus dans le sérum de patient. Le graphique de la figure 1.12b montre l'évolution des vitesses moyennes de déviation des microbilles PS en fonction de la concentration des anticorps IgE mesurée à l'aide de la technologie ImmunoCAP®. Les résultats fournis par Ki Hahn. Y et al³⁴ ont été réalisés sur 44 sérums de patient différents et indiquent une bonne corrélation entre les valeurs ImmunoCAP® et les valeurs mesurées par cette méthode avec un coefficient de variation inférieur à 10%. La plateforme microfluidique (figure 1.12b) conçue présente une limite de

détection inférieure au système ImmunoCAP® (0.05 ng/ml contre 2.4 ng/ml). Cette technologie permet une analyse rapide avec une quantité de sérum de patient faible (10 μ l) par rapport aux techniques conventionnelles utilisées (~50 μ l).

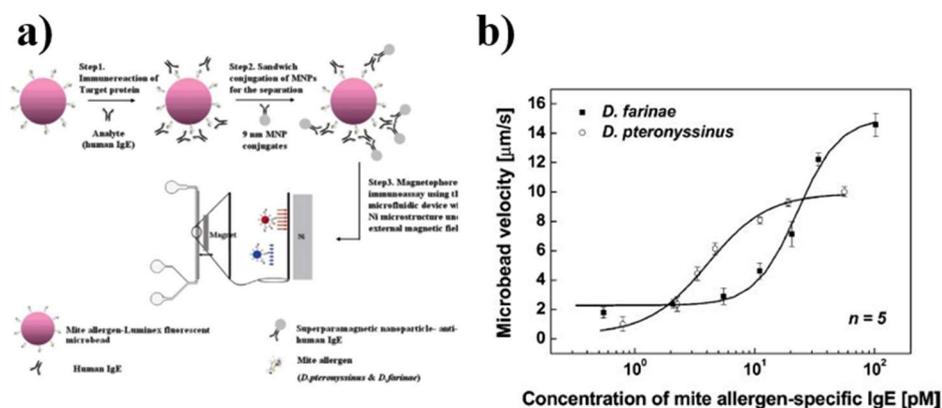


Figure 1.12 : a) Réaction des microbilles PS avec le sérum de patient et les nanobilles SPM permettant la déviation magnétophorétique³⁴, et b) Résultats présentant la vitesse de déviation magnétophorétique en fonction de la concentration en IgE des échantillons de sérums de patient³⁴.

1.3.2.2 Système microfluidique combinant la méthode ELISA et des microbilles PS

L'équipe de Ohashi.T et al a développé un nouveau système miniaturisé³⁵ basé sur la technologie ELISA pratique d'utilisation pour le diagnostic d'allergies rapide et sensible. La méthode utilisée se distingue par l'incorporation, dans son microdispositif, de microbilles PS fonctionnalisées avec des anticorps de capture (ciblant les allergènes). L'immunodosage de type « sandwich » est réalisé à la surface des microbilles PS. Les microbilles sont préconcentrées localement au sein de la puce microfluidique afin d'augmenter l'intensité du signal colorimétrique. De plus, l'utilisation de microbilles augmente la surface d'interaction de l'immunodosage. La réaction a lieu dans un système microfluidique permettant d'obtenir une précision et une sensibilité élevées. Le système est composé de différentes entrées de liquide pour les réactions nécessitant différents réactifs et solutions tampon ainsi que d'un pousse-seringue pour maîtriser les débits de flux à l'intérieur de la biopuce (figure 1.13a). Premièrement, les allergènes se fixent sur les anticorps de capture, puis les anticorps IgE du sérum se greffent sur les allergènes des microbilles PS. Une solution d'anticorps secondaires marqués à un enzyme est injectée pour permettre la détection des anticorps IgE. Des tests cliniques ont été réalisés (figure 1.13b) pour mesurer la concentration en IgE totaux et spécifiques. Le graphique représente l'intensité du signal fluorescent en fonction de la concentration en IgE totaux. Ohashi. T et al ont montré que la limite de détection de leur système est de 2 ng/ml, par ailleurs les résultats obtenus montrent une bonne corrélation avec ceux obtenus par la méthode conventionnelle ImmunoCAP®. Le volume de sérum nécessaire (5 μ l) est 10 fois inférieur, et le temps d'analyse (12 min) est plus de 20 fois plus rapide qu'avec les méthodes conventionnelles (150 min) actuellement utilisé par les allergologues et les laboratoires d'analyses médicales. Le procédé est entièrement automatisé et miniaturisé.

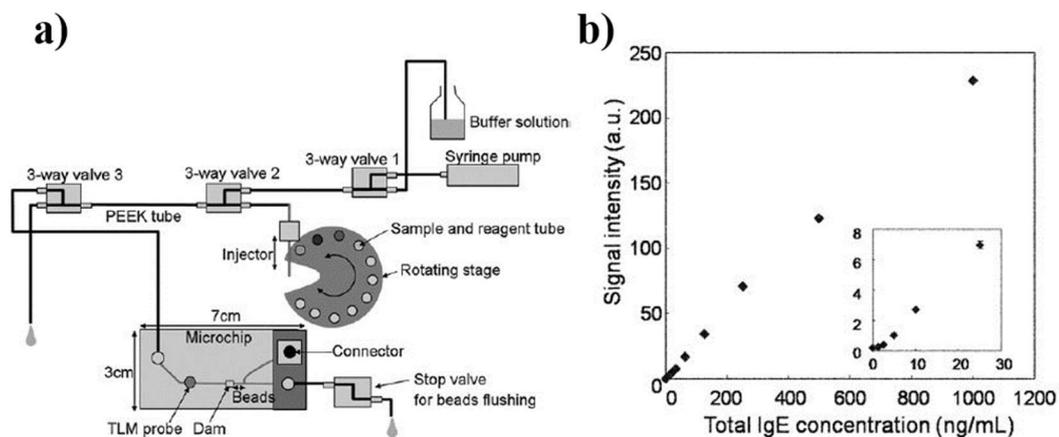


Figure 1.13 : a) Mécanisme d'automatisation du dispositif micro-ELISA par l'utilisation d'un pousse seringue, de valves, d'une biopuce et d'une platine tournante³⁵, b) Signal en fonction de la concentration en IgE total³⁵.

1.3.2.3 Immunodosage par cytométrie en flux

Une étude de 2012 réalisée par Pomponi. D et al³⁶ présente une technique d'immunodosage en multiplexe originale exploitant la cytométrie en flux appliqués aux microbilles pour la détection d'anticorps IgE. La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules ou des cellules en suspension dans un liquide à grande vitesse à travers le faisceau d'un laser pour les caractériser et/ou les compter. Lorsque la particule se trouve sur le trajet du laser, la lumière réémise (diffusion ou fluorescence) permet de classer la population suivant plusieurs critères (granulométrie ou fluorescence). Dans cette étude, des microbilles sont fonctionnalisées avec des allergènes puis mises en réaction avec du sérum de patient. Les anticorps spécifiques IgE sont mis en évidence par des anticorps secondaires marqués à la fluorescence PE (PhycoErythrine). Ainsi, l'intensité de fluorescence PE d'une microbille sera proportionnelle à la quantité d'anticorps IgE fixé à la surface. Il est également possible de discriminer les microbilles en fonction des allergènes greffés à leur surface par fluorescence. En effet, chaque population de microbilles est constituée de 2 fluorochromes (APC-A et APC-Cy7) suivant un ratio différent. La figure 1.14a, met en évidence la discrimination des allergènes de surface par mesure de l'intensité de 2 fluorescences : APC-A en abscisse et APC-Cy7 en ordonnée. De plus, la mesure de l'intensité de fluorescence PE permet de déterminer la concentration d'anticorps IgE correspondant à la microbille. La figure 1.14b présente l'intensité de fluorescence PE en abscisse et le nombre de microbilles comptées (en ordonnées) par niveaux d'intensité. Par conséquent, en utilisant la cytométrie en flux, le signal fluorescent de chaque microbille est analysé, d'abord pour reconnaître l'allergène de surface (figure 1.14a) puis pour évaluer la quantité d'IgE spécifiques fixés (figure 1.14b). Les résultats présentés démontrent la preuve de concept à partir des analyses de sérum de patient permettant la quantification de 16 anticorps spécifiques IgE simultanément à partir d'1 µl de sérum.

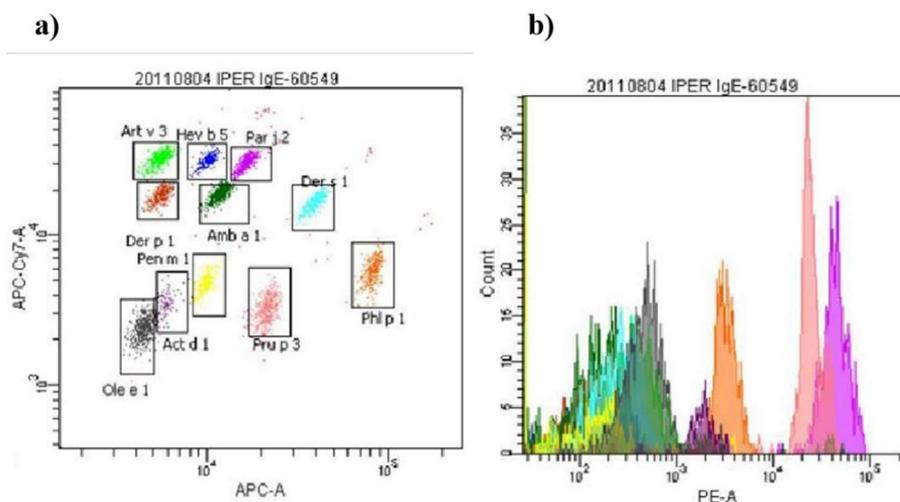


Figure 1.14 : Résultats du test de cytométrie en flux³⁶ : **a)** discrimination des microbilles et identification des allergènes de surface, **b)** comptage de chaque type de microbilles, **c)** rapport d'analyse d'un sérum de patient pour chaque allergène testé.

1.3.2.4 Microdispositif électrophorétique pour la détection de protéines

Le groupe de recherche de Barbee. K.D a publié une étude montrant le développement d'un microdispositif d'assemblage électrophorétique pour l'assemblage de microbilles dédié à la détection de protéines³⁷ (figure 1.15). Ils ont démontré que des microbilles fluorescentes de polystyrène (0.4 et 1 μ m) conjuguées avec des anticorps reconnaissant une protéine cible peuvent être rapidement assemblées sur une surface contenant des micropuits (figure 1.15a). Les microbilles sont assemblées rapidement par électrophorèse grâce à l'application d'un champ électrique pulsé à travers la chambre fluïdique. Les microbilles s'auto-organisent suivant un réseau en 2 dimensions (figure 1.15b et 1.15c). L'échantillon de sérum de patient à tester est ensuite injecté dans la chambre fluïdique où les protéines d'intérêt vont se fixer sur les microbilles déposées (figure 1.15d). Une solution contenant des anticorps secondaires fluorescents est ensuite ajoutée afin de détecter les protéines d'intérêt. A chaque endroit où réside une microbille, l'intensité de fluorescence est mesurée grâce à un microscope à fluorescence. Les résultats montrés sur la figure 1.15e représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration d'anticorps primaire. Ce résultat met en évidence la corrélation entre l'intensité de fluorescence et la concentration en anticorps primaires contenus dans le sérum de patient. En effet, le graphique montre une régression polynomiale avec un R^2 égal à 0.996 ou 0.994 en fonction de l'anticorps primaire utilisé : lapin ou souris. La limite de détection atteinte est de 6 ng/ml pour un temps de procédé de 3 h. Cette technologie est suffisamment sensible pour permettre la détection d'anticorps contenus dans le sérum de patient, en particulier les anticorps IgE spécifiques. Cette technique permet de tester plusieurs antigènes en même temps grâce à un encodage spatial et fluorescent. Barbee. K.D et al ont utilisé deux anticorps secondaires possédant une fluorescence différente pour pouvoir les distinguer. De plus, des assemblages successifs ont été réalisés (jusqu'à 10 fois). La nature de l'antigène présent à la surface des microbilles assemblées est modifiée à chaque itération. L'observation *in-situ* entre ces différents assemblages permet d'enregistrer, pour chaque emplacement, la nature de l'antigène de surface en fonction de la position de la microbille.

Malgré le temps de procédé important (3 h) cette méthode présente des possibilités de multiplexage multiples qui pourrait être exploités pour le diagnostic d'allergies.

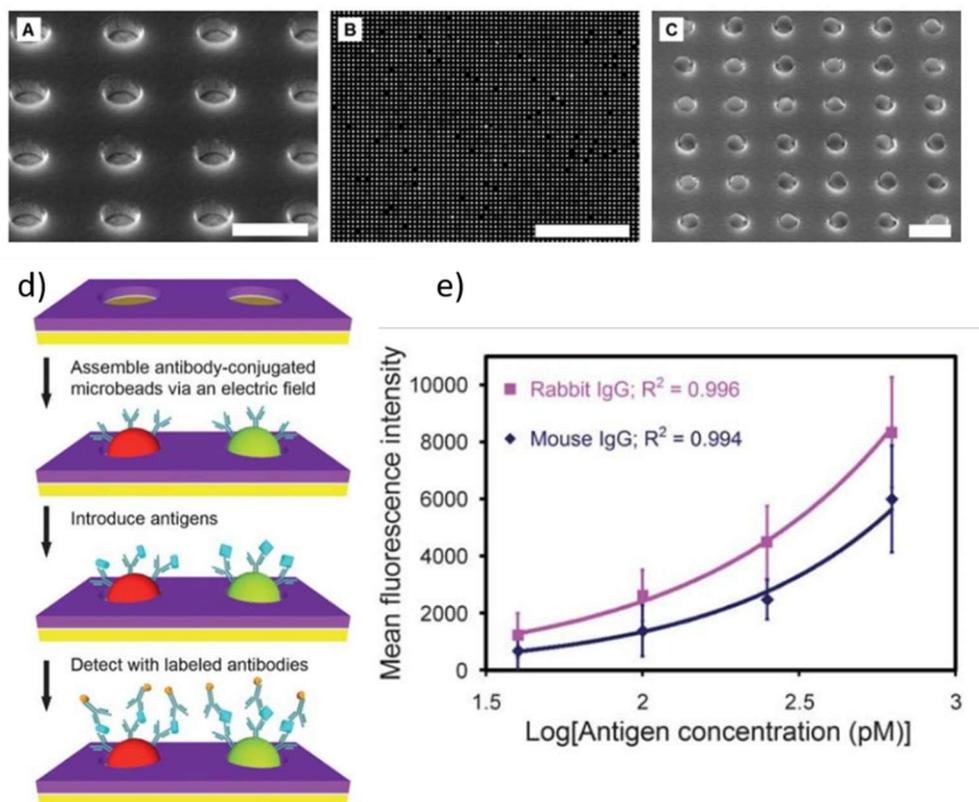


Figure 1.15 : a) image MEB des microstructures de l'échantillon (échelle 3 μm), assemblage électrophorétique des microbilles PS³⁷ b) échelle 200 μm ³⁷, c) échelle 5 μm ³⁷, d) principe de l'immunosage par microbilles au sein du microdispositif électrophorétique³⁷, e) résultats du signal de fluorescence en fonction de la concentration de l'analyte à détecter³⁷.

1.3.2.5 Microparticules Luminex

Le groupe de recherche de Chapman. MD a présenté une étude³⁸ qui a permis de développer et de valider l'utilisation de microsphères (5,6 μm) pour la détection simultanée des anticorps IgE totaux et des anticorps spécifiques dirigés vers une gamme d'allergènes fixée (7 différents). La figure 1.16a montre le principe³⁹ de l'immunosage en sandwich réalisé à la surface des microbilles PS (1). L'allergène à tester (2) est fixé à surface de la microsphère via un anticorps d'accroche. Après incubation avec le sérum de patient (20 μl), les anticorps IgE spécifiques (3) vont se fixer sur les allergènes. Le signal est détecté via un anticorps secondaire (4) possédant un marqueur fluorescent : la streptavidine phycoérythrine (5). Le temps de procédé global est de 6 h. Les microsphères peuvent être mélangées suivant des combinaisons différentes pour sélectionner les allergènes à tester afin de s'adapter à l'historique clinique du patient. La figure 1.16b montre la comparaison des concentrations des anticorps IgE totaux mesurées avec la méthode Luminex (Multiplex en ordonnée) et la méthode ImmunoCAP indiquée en abscisse. Le graphique montre les mesures de concentrations effectuées pour 63 sérums de patient différents représentées par les points bleus. L'étude a montré une corrélation importante entre les résultats obtenus avec les 2 méthodes. La figure 1.16c montre la comparaison des

concentrations en IgE spécifique anti Der p 2 mesurées avec la méthode Luminex (Multiplex en ordonnée) et ImmunoCAP (Streptavidin CAP en abscisse). L'étude a montré que la corrélation était significative entre les 2 méthodes. La limite de détection pour ce dispositif est de 0,7 ng/ml. Le système Luminex est un dispositif commercialisable et est utilisé dans certains laboratoires d'analyse médicale. Il est basé sur la technologie décrite dans ces travaux de recherche et permet d'effectuer des mesures de concentration d'anticorps IgE totaux et spécifiques, et est également utilisé pour des diagnostics biomédicaux avec un multiplexage atteignant 100 analytes différents testés simultanément.

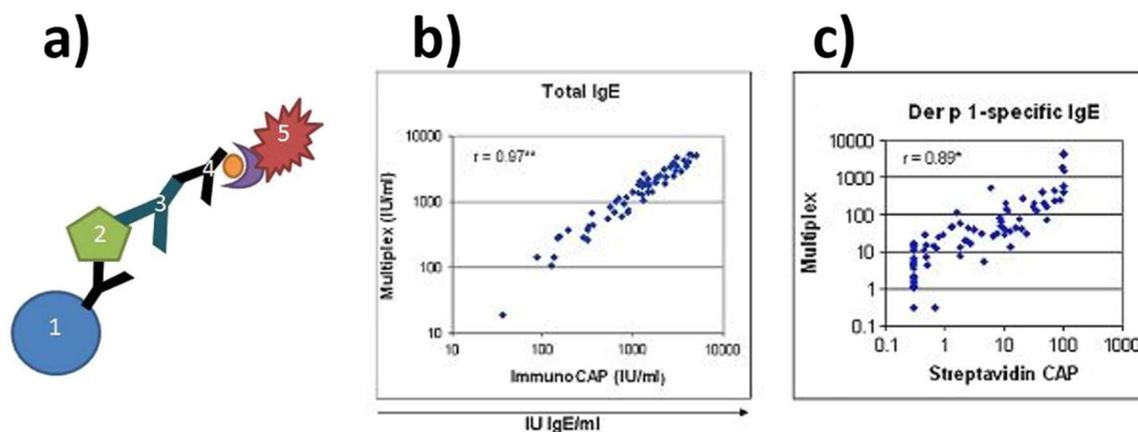


Figure 1.16 : a) Schéma de principe de l'immunodosage des microparticules Luminex³⁹, b) comparaison des concentrations en anticorps IgE totaux mesurées par technologie ImmunoCAP® et microparticules Luminex (Multiplex)³⁸, c) Comparaison des concentrations en anticorps IgE spécifiques Der p 1 mesurées par ImmunoCAP® et Luminex (Multiplex)³⁸.

1.3.3 Test d'agglutination

1.3.3.1 Test d'agglutination de nanoparticules

Chinnasamy. T et al ont présenté un outil de diagnostic⁴⁰ répondant au besoin croissant d'un test de dépistage des allergies en multiplexe permettant d'établir le profil de sensibilisation d'un patient rapidement. Il est basé sur le principe d'agglutination de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps secondaires anti-IgE. Des spots de différents allergènes sont disposés sur une membrane de nitrocellulose puis le sérum de patient est déposé à ces emplacements (figure 1.16a). Après fixation des anticorps spécifique IgE, une suspension de nanoparticules d'or est ajoutée. L'agglutination des nanoparticules d'or sur un spot révèle la présence d'anticorps IgE par coloration et représente un test positif à ces allergènes. Le principe de ce système est semblable au système ImmunoCAP® rapid décrit dans la section 1.2.3.3. La figure 1.16b montre l'évolution de l'intensité du signal colorimétrique en fonction la concentration en anticorps spécifiques IgE contenus dans le sérum de patient. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la valeur du signal dépend de la concentration en anticorps IgE (figure 1.16b). Le temps de procédé est de 10 min, la limite de détection et de 2,4 ng/ml et nécessite 30 à 50 μ l de sérum de patient par test.

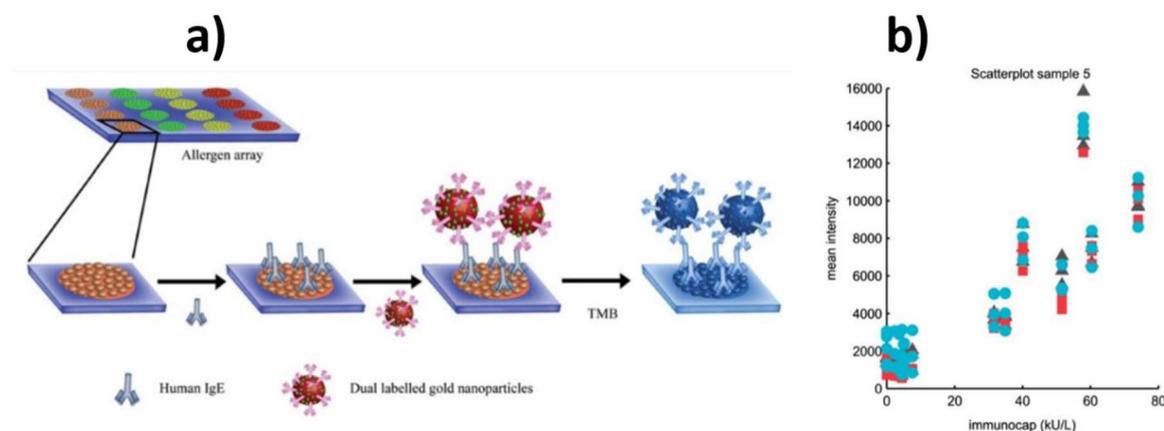


Figure 1.17 : a) Principe de détection des anticorps IgE sur papier à base de nitrocellulose contenant des spots d'allergènes⁴⁰, b) signal colorimétrique en fonction de la concentration en IgE des sérums de patient testés et de différentes microbilles⁴⁰.

1.3.3.2 Test d'agglutination : Immunodosage nanofluidique (Abionic SA©)

Le dispositif abioSCOPE³⁹ produit par la société Abionic SA est basé sur le principe de l'immunodosage nanofluidique par agglutination. La figure 1.18a représente le schéma de principe, les allergènes à tester (en jaunes) sont fixés sur une couche d'adhésion reposant sur une paroi d'un canal microfluidique. Après incubation avec le sérum de patient, les anticorps IgE symbolisés en vert vont se fixer sur les allergènes. Puis, des anticorps secondaires marqués à la fluorescence vont permettre de détecter et de mesurer la concentration en anticorps IgE spécifiques contenus initialement dans le sérum de patient. Abionic SA a utilisé et a également développé un dispositif opérationnel de dépistage des allergies suivant cette méthode (figure 1.18b). Le sérum de patient (50 μ l) est mélangé avec un réactif puis placé sur une capsule de test composée de multiples biocapteurs nanofluidiques contenant les allergènes permettant de mettre en évidence les anticorps IgE spécifiques du sérum de patient. Cette capsule est ensuite placée sur un disque qui est inséré dans le dispositif abioSCOPE à travers un lecteur DVD. Les résultats sont ensuite présentés sur un écran numérique tactile de type iPad et sauvegardés sur une carte SD standard. Le temps de procédé global est de 15 min avec une limite de détection de 1,4 ng/ml.

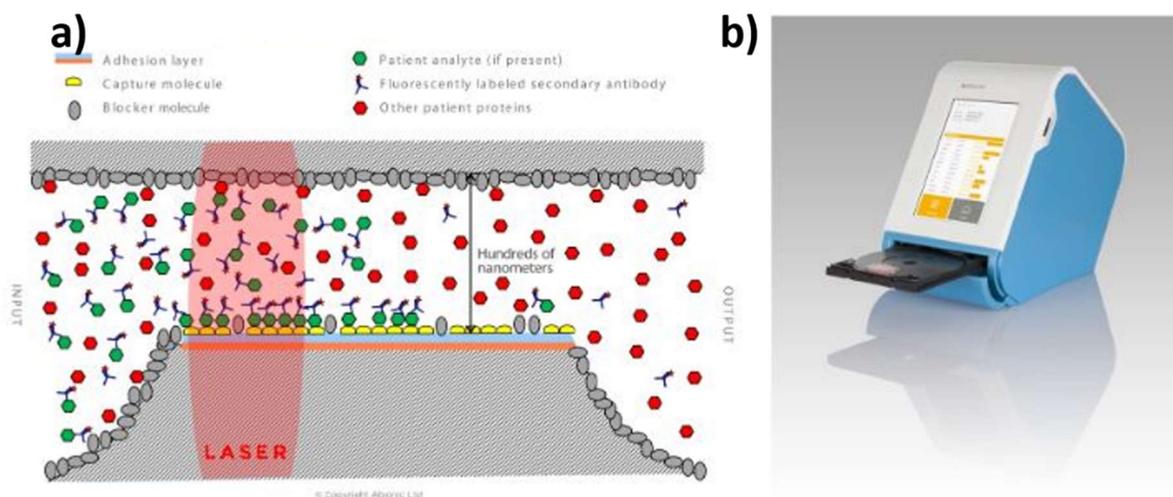


Figure 1.18 : a) Principe de l'immunos dosage nanofluidique, b) Dispositif abioSCOPE de diagnostic des allergies basé sur la technologie d'immunos dosage nanofluidique commercialisé par Abionic SA ³⁹.

Afin de comparer ces différentes technologies répertoriées dans cette partie, nous avons classé leurs performances selon 3 critères dans le tableau 1.2. Le temps de réaction, le volume de sérum de patient utilisé et la limite de détection atteinte y ont été reportées pour chaque technologie⁴¹. L'analyse la plus rapide est de 5 min, le volume le plus faible de 1 μ l et la limite de détection la plus faible est de 0,084 ng/ml. Ces records de performances ne sont pas atteints par les mêmes méthodes, il y a donc un compromis à effectuer entre temps de réaction, volume de sérum et limite de détection lorsqu'un outil de diagnostic est choisi ou mis en place.

Méthodes	Temps de réaction	Volume de sérum	Limite de détection
Electrophorèse	50 minutes	1 µl	2,44ng/ml
ELISA avec microbilles magnétiques	1 heure	1,5 µl	17,5 ng/ml
Biopuce avec des nanoparticules magnétiques	20 minutes	5 µl	1 ng/ml
Magnétophorèse	30 minutes	10 µl	0,084 ng/ml
ELISA avec microbilles PS	12 minutes	5 µl	2 ng/ml
Cytométrie en flux	2 heures 30 minutes	1 µl	Pas de données
Assemblage de microbilles et électrophorèse	3 heures	Pas de données	6 ng/ml
Microparticules Luminex	6 heures	20 µl	0,7 ng/ml
Agglutination de nanoparticules	10 minutes	30 – 50 µl	2,4 ng/ml
abioSCOPE, Abionic SA	5 minutes	50 µl	1,4 ng/ml

Tableau 1.2 : Récapitulatif des performances de technologies de diagnostic d'allergies.

Les nano et microparticules sont de plus en plus étudiés en raison de leurs propriétés physique et chimique. Ces propriétés génèrent une surface de réaction plus importante et une meilleure diffusion que pour des matériaux traditionnels. La maîtrise de la manipulation de ces objets a permis leur utilisation dans plusieurs applications. Au cours de ces vingt dernières années, des études ont mis en évidence l'avantage que présentent ces objets pour le diagnostic biomédical. Nous avons regroupé les principaux travaux de recherche dans ce domaine en 2 parties : ceux où les particules PS sont utilisées comme support d'immunodosage et ceux où ce sont les particules magnétiques.

Particules PS en tant que support d'immunodosage

Ces microbilles sont utilisées comme phase solide d'immunodosage pour révéler la présence d'anticorps IgE par fluorescence. Leur manipulation permet d'obtenir une préconcentration des microbilles afin d'augmenter le signal mesuré. La méthode magnétophorétique remplace le marquage enzymatique par un marquage magnétique en mesurant la déviation magnétophorétique de microbilles PS ayant réagi avec du sérum de patient allergique et des nanobilles magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps anti-IgE.

Particules magnétiques en tant que support d'immunodosage

Nous avons vu que l'utilisation des particules magnétiques en tant que support d'immunocapture présente certains avantages. Tout d'abord, leur manipulation simple et efficace permet de réaliser les étapes de lavages rapidement et de les préconcentrer pour augmenter l'intensité du signal de détection et/ou de quantification. Ces particules magnétiques peuvent être intégrées avec un système d'aimant permanent à l'intérieur

d'un dispositif miniaturisé car leur manipulation est plus rapide et plus précise qu'avec des particules non-magnétiques.

1.4 Projet de diagnostic d'allergie par technologie microbilles développé au LTM

Dans cette partie, nous présentons le projet recherche de diagnostic d'allergies par technologie microbilles développé au laboratoire LTM au cours de ma thèse. L'idée innovante du projet est le développement d'une technologie hybride de diagnostic d'allergie en combinant la réaction d'immunosorbent de type « sandwich » à la surface de microbilles PS comme phase solide et d'effectuer un marquage magnétique à l'aide de microbilles SPM pour s'affranchir des contraintes dues au marquage enzymatique des anticorps secondaires. Cette technologie repose sur la détection de microbilles individuelles et permet une dynamique de détection importante et la possibilité de tester plusieurs allergènes simultanément (multiplexage). Les extraits d'allergènes sont testés et mis à notre disposition par notre partenaire spécialisé en pharmacologie du laboratoire PharmaDev à Toulouse. Les sérums de patient sont fournis et sont analysés préalablement à l'aide de la technologie ImmunoCAP® par le laboratoire d'analyses médicales spécialisées en allergies de notre deuxième partenaire basé au centre hospitalier de Lyon sud. Le principe de détection repose sur 4 étapes : la biofonctionnalisation, la réaction avec le sérum suivi du tri magnétique, l'assemblage des microbilles et la lecture des résultats.

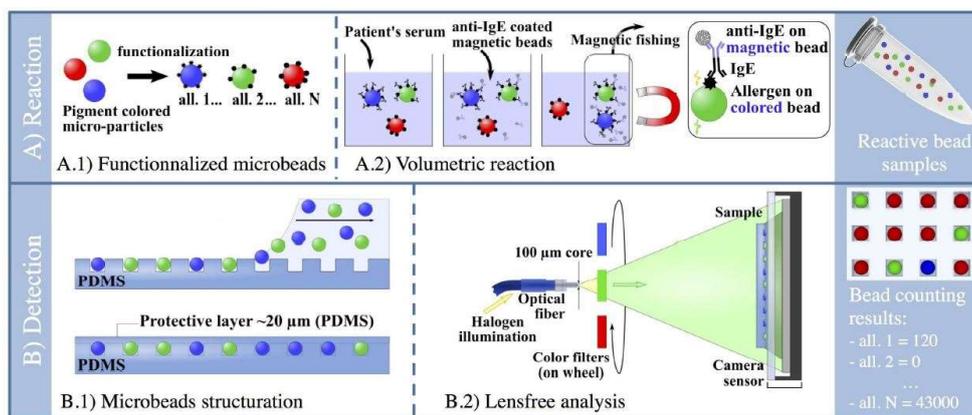


Figure 1.19 : Schémas du principe de diagnostic d'allergies par technologie microbilles développé au sein du laboratoire LTM.

1.4.1 Préparation des extraits d'allergènes et biofonctionnalisation des microbilles

Tout d'abord, les extraits d'allergènes fournis seront immobilisés à la surface des microbilles PS par des liaisons covalentes. Parallèlement, les microbilles magnétiques seront fonctionnalisées avec des anticorps secondaires anti-IgE. Nous allons choisir les méthodes permettant de biofonctionnaliser les deux types de microbilles PS et SPM en réalisant une étude bibliographique. Les microbilles seront aussi fonctionnalisées avec des protéines BSA qui ne réagissent pas avec le sérum de patient et qui constitueront les tests témoins. L'extrait d'allergène et la protéine BSA seront associés à des couleurs de pigmentation différentes des microbilles PS. La pigmentation est photostable contrairement au marquage fluorescent dont

l'intensité peut diminuer par le phénomène de photobleaching. Ces microbilles seront utilisées comme support de marquage magnétique des microbilles PS. La biofonctionnalisation sera mise en évidence à l'aide des anticorps secondaires anti-IgE marqués à la fluorescence FITC.

1.4.2 Incubation des microbilles PS avec le sérum de patient et tri magnétique

Dans un premier temps, une étude bibliographique sur le tri magnétique sera réalisée afin de choisir les outils, la technologie adaptée et la taille des microbilles PS et SPM. Des expériences préliminaires seront effectuées pour comprendre comment récupérer uniquement les microbilles ayant réagi avec le sérum de patient, à savoir ayant capturé des anticorps IgE à leur surface. Tout d'abord, les microbilles PS seront incubées avec le sérum de patient contenant des anticorps IgE qui se fixeront sur la microbille par des liaisons allergènes – anticorps. Puis, les microbilles SPM réagiront avec les microbilles PS recouvertes d'IgE en se liant ensemble. Un dispositif aimanté récupérera uniquement les microbilles PS marquées magnétiquement avec les microbilles SPM. Nous étudierons l'influence de la concentration des anticorps IgE contenus initialement dans le sérum de patient sur la proportion de microbilles piégées magnétiquement. Les résultats attendus sont une augmentation de l'efficacité du piégeage magnétique avec la concentration d'IgE du sérum de patient. L'objectif est de valider la méthode sur 3 allergies différentes : arachide, noisette et crevette. Les extraits d'allergènes et les sérums de patient allergiques seront fournis par nos partenaires.

1.4.3 Assemblage des microbilles sur une surface microstructurée

La dernière étape pour évaluer la concentration d'anticorps IgE du sérum analysé est le comptage du nombre de microbilles piégées par le tri magnétique. Nous utiliserons une méthode d'assemblage pour transférer les particules contenues dans un volume de liquide sur une surface microstructurée. L'assemblage thermodynamique développé au laboratoire LTM est une compétence acquise depuis plusieurs années au sein de notre laboratoire et permet un positionnement précis de micro-nanoparticules dont les résultats ont fait l'objet d'une création de start-up (<http://www.smartforcetechnologies.com/>). La méthode et les outils mis à notre disposition constitueront notre base de travail pour l'élaboration d'un protocole et d'un dispositif expérimental dédié à l'assemblage de microbilles PS. Les microbilles seront disposées sur une surface suivant un réseau 2D dense pour optimiser l'étape de comptage par des moyens optiques. La méthode sera testée sur les microbilles PS 10 μm et pourrait permettre en théorie l'assemblage de 10^6 microbilles le plus rapidement possible (< 1 h).

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre les concepts fondamentaux portant sur le diagnostic des allergies par technologies microbilles ont été abordés.

Les outils de diagnostic des allergies se divisent en 2 catégories : les tests *in-vivo* sont représentés par des tests de provocation sur la peau et les tests *in-vitro* dont l'objectif est de mesurer la concentration des anticorps spécifiques IgE contenus dans le sérum de patient. Parmi ces tests *in-vitro*, nous avons décrit les outils de diagnostic mis à disposition des professionnels de santé tels que les bancs de test automatisés, les biopuces multiplexes et les systèmes miniaturisés de type point-of-care.

Un état des lieux des techniques de diagnostic d'allergies par l'utilisation de nano et/ou microparticules a été dressé. Premièrement nous nous sommes intéressés au test où les microbilles magnétiques sont le support de l'immunodosage et dans un deuxième temps où ce sont les microbilles PS qui jouent ce rôle. L'utilisation de particules de tailles nano-micrométriques permet une diffusion plus rapide et une intégration dans des systèmes miniaturisés. Par conséquent, il est possible d'effectuer les analyses avec un volume de sérum plus faible avec un temps de procédé plus court qu'avec les techniques conventionnelles.

Nous avons décrit la méthode de détection des anticorps IgE par l'utilisation de 2 types de microbilles : des microbilles PS d'une part et des microbilles SPM d'autre part. Cette méthode combine 3 technologies : la biofonctionnalisation des microbilles, le tri magnétique et l'assemblage de microbilles unique sur une surface structurée. Ces 3 technologies ont été développées au cours de nos travaux de thèse sur ce projet de recherche.

Problématique de la thèse :

Dans ce mémoire de thèse, nous allons proposer une méthode de détection des anticorps IgE par l'utilisation de microbilles. L'un des objectifs de thèse sera d'apporter la preuve de concept de l'analyse de sérum de patient appliqué sur un ou plusieurs allergènes différents. Pour cela, chaque technologie (biofonctionnalisation, tri magnétique et assemblage de microbilles) sera développée individuellement. Nous effectuerons une étude sur les points de fonctionnement pour optimiser les protocoles et fournir une méthode dédiée à la détection d'anticorps IgE. Puis les tests sur les sérums de patient seront effectués et les résultats détermineront les performances de cette méthode pour les comparer aux méthodes conventionnelles actuellement utilisées et mis à disposition des professionnels de santé et des particuliers.

Chapitre 2 : Biofonctionnalisation de microbilles

2.1 Introduction	40
2.1.1 Les microbilles	40
2.1.2 Les ligands (allergènes et anticorps)	40
2.1.3 Complexe de microbilles	42
2.2 Biofonctionnalisation	43
2.2.1 Biofonctionnalisation des microbilles polystyrènes.....	43
2.2.2 Biofonctionnalisation des microbilles superparamagnétiques	46
2.2.3 Dispositif expérimental	47
2.3 Caractérisation de la biofonctionnalisation	49
2.3.1 Microbilles polystyrènes.....	49
2.3.2 Microbilles magnétiques	55
2.4 Conclusion	56

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le projet de diagnostic d'allergies nécessite deux types de microbilles : des microbilles PS (polystyrènes) et des microbilles SPM (SuperParaMagnétiques). Ces microbilles doivent être enrobées de biomolécules : des allergènes ou des anticorps secondaires. Cet enrobage peut s'effectuer grâce à la biofonctionnalisation dont l'objectif est de créer des liaisons covalentes entre la biomolécule d'intérêt et la microbille. Cette étape est très importante puisqu'elle établit le greffage des protéines et des anticorps tout autour de la microbille pour la reconnaissance des anticorps primaires spécifiques IgE présents dans le sérum de patient allergique (figure 2.1).

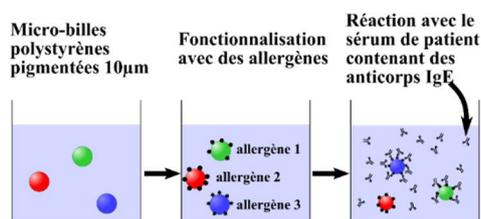


Figure 2.1 : Schéma du principe de diagnostic d'allergies *in-vitro* par technologie microbilles.

Le principe de biofonctionnalisation employé ici consiste à créer une liaison covalente entre un groupement amine de la protéine et les molécules situées à la surface de la microbille⁴²⁻⁴⁴. Contrairement au greffage des protéines par adsorption cette méthode permet une meilleure résistance aux procédés de centrifugation, de magnétisation ou d'agitation mécanique utilisés lors des procédés de bio-fonctionnalisation et de tri magnétique que nous décrirons par la suite.

Dans un premier temps, les différents types de microbilles utilisées seront présentés ainsi que les matériaux, les tailles, la bio-fonctionnalisation de surface, et le marquage des microbilles nécessaires pour notre application. Puis nous détaillerons les propriétés chimiques des ligands (allergènes et anticorps) destinés à être greffés sur les microbilles. Nous expliquerons également comment a été mis en place le dispositif et le protocole expérimental.

Dans un deuxième temps, les grandes étapes du greffage des extraits d'allergènes (arachide, crevette et noisette) à la surface des microbilles polystyrène carboxylés seront abordées. Puis

nous caractériserons cette fonctionnalisation par deux méthodes : une quantitative et l'autre qualitative.

Enfin, nous exposerons le procédé de biofonctionnalisation des particules SPM par des anticorps secondaire (anti-IgE ou anti-IgG). Une analyse qualitative de ce procédé sera réalisée par la microscopie à fluorescence.

2.1 Introduction

Afin de comprendre le processus de formation des complexes de microbilles biofonctionnalisées, les propriétés physico-chimiques des microbilles doivent être décrites ainsi que les propriétés générales des protéines utilisées : les anticorps et les allergènes.

2.1.1 Les microbilles

Les microbilles polystyrènes seront utilisées en tant que matériau support des allergènes. Elles sont très utilisées dans les applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité⁴⁵⁻⁴⁷. Le polystyrène a une masse volumique faible : 1.05g/cm^3 ce qui induit une sédimentation lente et limite le dépôt des microbilles par gravitation. Il permet également une bonne visualisation des microbilles, car son indice de réfraction ($n_{ps}=1.6$)⁴⁸ est suffisamment supérieur à celui du PDMS ($n_{pdms}=1.4$)⁴⁹ qui est le matériau du support de comptage utilisé lors de l'étape d'assemblage. Afin d'être capable de visualiser les microbilles facilement au microscope ou par un système d'imagerie sans lentille grand champ ($>$ quelques mm^2), nous avons opté pour un diamètre de $10\ \mu\text{m}$ et une coloration par pigmentation pour les microbilles PS. La pigmentation permet une discrimination des microbilles sans recourir à la fluorescence. Une fonctionnalisation de surface avec des groupements carboxyles a été choisi pour utiliser une chimie de type « cross-linking »⁵⁰. Une molécule « cross-linker » crée un lien covalent en se fixant d'une part sur la microbille et d'autre part sur la protéine d'intérêt.

Les microbilles magnétiques sont dites SuperParaMagnétiques (SPM). Elles réagissent sous l'influence d'un champ magnétique, mais présentent une aimantation nulle à champ nul ce qui évite leur agglomération. Si l'aimantation était non nulle, les microbilles agiraient comme des dipôles magnétiques induisant des interactions entre les particules. Les microbilles Dynabeads® Myone™ tosyl-activated^{51,52} sont idéales pour développer la technologie de tri magnétique que nous aborderons dans le chapitre suivant. Leurs propriétés magnétiques sont couramment utilisées pour les immunodosages^{30,32,53} et les séparations magnétiques^{54,55}. Elles sont constituées de nanoparticules d'oxydes de fer emprisonnées dans une matrice de polystyrène⁵⁶. Elles mesurent $1\ \mu\text{m}$ de diamètre et sont recouvertes de groupes ester sulfonyles qui réagissent avec les groupements amines primaires, présents en abondance à la surface des protéines.

2.1.2 Les ligands (allergènes et anticorps)

2.1.2.1 Les allergènes

Un allergène est une protéine capable de provoquer une réaction allergique chez un sujet préalablement sensibilisé lorsqu'il est à son contact (le plus souvent par contact avec la peau, inhalation ou ingestion). Pour l'étape de fonctionnalisation, nous utiliserons des extraits d'allergènes qui sont constitués de différentes protéines allergéniques ainsi que trois extraits d'allergènes différents : arachide, noisette et crevette. La nomenclature utilisée pour nommer systématiquement un allergène connu est approuvée par l'OMS et l'IUIS (International Union of immunological societies)⁵⁷. Le nom est composé d'une abréviation du nom scientifique latin de la source allergénique et d'un numéro, le tableau 2.1 indique le nom des différents allergènes

utilisé et mis à notre disposition par l'équipe Pharma-Dev. Ainsi, nous nommerons les différents allergènes de l'arachide, de la noisette et de la crevette en utilisant cette nomenclature. Un allergène est dit « majeur » quand un antigène purifié déclenche une allergie chez 50 % ou plus des patients testés, et qu'il présente des IgE spécifiques, avec des tests cutanés immédiatement positifs, à une concentration très faible, chez au moins 90 % des sujets ayant la maladie allergique en relation avec cet allergène. L'allergie à l'arachide déclenche des chocs anaphylactiques chez certains patients avec une très faible dose d'allergènes ce qui a fait l'objet de nombreuses études⁵⁸. *Ara h 1*, *Ara h 2* et *Ara h 3* sont les trois allergènes majeurs de l'allergie à l'arachide dont la représentation 3D est montrée sur la figure 2.2. Ces trois protéines diffèrent par leurs tailles, leur forme et leurs séquences en acides ce qui induit des différences sur le déclenchement et le rôle dans les symptômes allergiques.

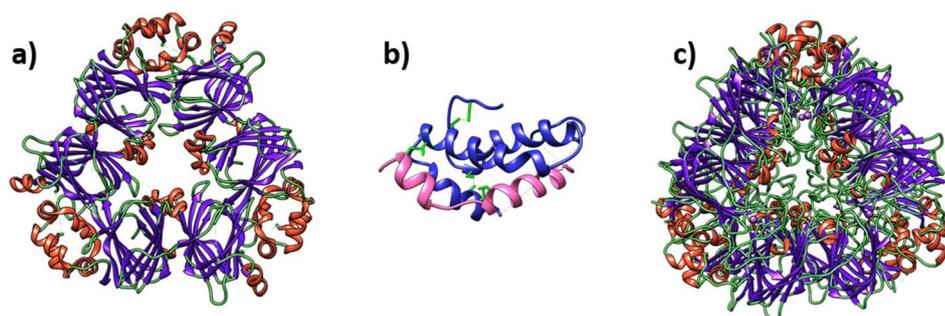


Figure 2.2 : Allergènes majeurs de l'arachide a) *ara h 1*, b) *Ara h 2* et c) *Ara h 3* modélisés par le logiciel Chimera.

Allergie	Arachide	Noisette	Crevette
Nombre d'allergènes	12	9	6
Dénomination (IUIS)	<i>Ara h 1-3</i> et <i>Ara h 5-13</i>	<i>Cor a 1-2</i> , <i>Cor a 8-14</i>	<i>Cra c 1-2</i> , <i>Cra c 4-6</i> et <i>Cra c 8</i>

Tableau 2.1 : Liste des différents allergènes protéiques pour l'arachide, la noisette et la crevette.

2.1.2.2 Les anticorps

Un anticorps est une molécule biologique impliquée dans l'immunité. C'est une glycoprotéine de la famille des immunoglobulines subdivisées en 5 classes ou isotypes (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM). Ils sont formés par deux chaînes lourdes identiques (H pour *heavy*) et de deux chaînes légères identiques (L pour *light*), comme l'indique la figure 2.3. Ils sont souvent représentés en Y, où les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures au niveau de la tige du Y. Les deux chaînes légères sont associées aux chaînes lourdes au niveau des bras du Y, également par des ponts disulfures. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL) alors que les chaînes lourdes sont constituées de plusieurs domaines constants contenus dans une partie constante que nous nommerons (CH) et d'un domaine variable (VH). Ainsi, un anticorps possède 4 domaines variables (2VL et 2VH) situés aux extrémités des deux bras. La combinaison d'un domaine variable d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde constitue le site de reconnaissance de l'antigène. Un anticorps possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras.

Sites de fixation à l'antigène (paratopes)

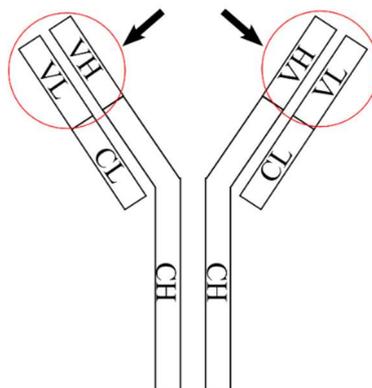


Figure 2.3 : Schéma d'un anticorps. Il est composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les parties variables (VL et VH) et les parties constantes (CL et CH) constituent les différents domaines de l'anticorps.

2.1.3 Complexe de microbilles

Dans le cas de l'allergie, les antigènes sont des allergènes. Les anticorps contenus dans le sérum de patient sont d'isotype IgE pour les sérums humains employés pour les tests cliniques et d'isotype IgG pour les sérums de lapin que nous utiliserons dans le chapitre 3. Les allergènes greffés sur la surface des microbilles PS, se fixent via les paratopes (partie de l'anticorps qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène). Ces anticorps sont dits « primaires », car ils reconnaissent spécifiquement un allergène via un épitope (partie d'un antigène reconnu par un paratope d'un anticorps associé). Un allergène possède plusieurs épitopes. Les anticorps secondaires sont attachés sur la surface des microbilles SPM. Ces anticorps reconnaissent la partie constante de l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires utilisés seront soit anti-IgE soit anti-IgG afin de reconnaître les anticorps primaires IgE ou IgG. C'est grâce à ces propriétés de reconnaissance qu'une liaison s'établit entre les microbilles PS et SPM et que se forme le complexe de microbilles représenté par le schéma de la figure 2.4.

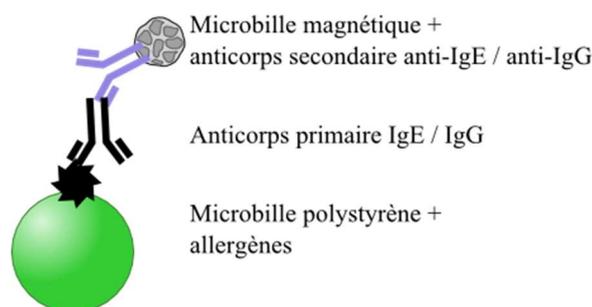


Figure 2.4: Schéma du complexe de microbilles.

Nous avons présenté les deux catégories de microbilles utilisées. D'une part, les microbilles PS destinées à être enrobées d'allergènes présentent les propriétés suivantes : diamètre de 10 μm , indice optique $n=1,6$, pigmentées et présentant une fonctionnalisation de surface carboxyles. D'autre part, les microbilles SPM mesurent 1 μm de diamètre et présentent une fonctionnalisation de surface esters sulfonyles. Les

propriétés des allergènes et des anticorps destinés à être greffés à la surface des microbilles ont été décrites. Les microbilles PS-SPM forment des complexes de microbilles via les liaisons allergène - anticorps primaire et anticorps primaire – anticorps secondaire.

2.2 Biofonctionnalisation

Dans un premier temps, nous allons décrire le principe de biofonctionnalisation des microbilles polystyrènes par des extraits d'allergènes.

2.2.1 Biofonctionnalisation des microbilles polystyrènes

Les fonctions carboxyliques sont très intéressantes pour les applications biologiques, car elles permettent d'accrocher des biomolécules de façon covalente. La liaison des groupements carboxyliques avec les fonctions amines, disponibles en grande quantité dans les biomolécules en général, nécessite une étape d'activation des fonctions carboxyliques pour les transformer en ester activé.

Les composés contenant des fonctions carbodiimide N-C-N sont des agents déshydratants souvent utilisés pour activer les acides carboxyliques COOH dans le but de faciliter leur couplage avec les amines primaires NH₂ et ainsi créer des liaisons amides COONH.

2.2.1.1 Activation des groupements carboxyles

Pour activer les groupements carboxyliques présents à la surface de la microbille PS, nous avons utilisé de l'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide), qui est un carbodiimide soluble dans l'eau. L'ajout de ce dernier génère l'ester activé intermédiaire par la réaction d'addition du groupement OH de l'acide carboxylique sur le carbone électrodéficient de l'EDC, comme le montre la figure 2.5.

Cependant, l'EDC n'est pas particulièrement efficace pour le couplage des groupements COOH avec les amines portées par les allergènes. En effet, l'ester activé est instable en solution aqueuse. Pour cette raison, nous combinons l'utilisation de l'EDC avec du sulfo-NHS (sulfo-Hydroxysuccinimide) voir figure 2.5). Ce composé est souvent utilisé pour augmenter l'efficacité du couplage COOH-NH₂⁵⁹.

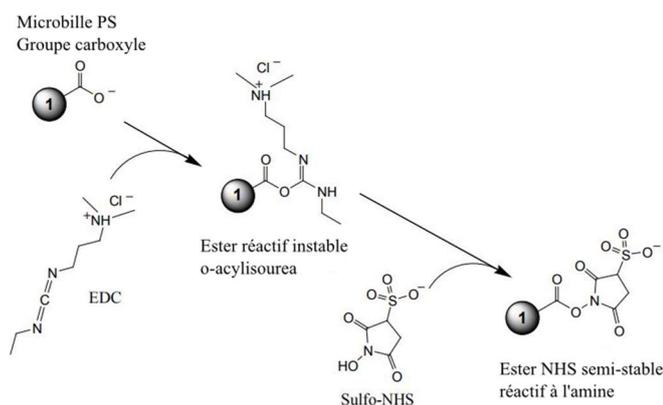


Figure 2.5 : Schéma de réaction de l'EDC et du sulfo-NHS sur les groupes COOH de la microbille polystyrène.

Après cette étape d'activation des groupements carboxyliques, les allergènes peuvent être attachés de manière covalente à la surface des microbilles magnétiques par la réaction d'amidation.

Nous avons développé un protocole de fonctionnalisation à partir de différents protocoles trouvés dans la littérature^{50,60,61}.

Tout d'abord 10^7 microbilles PS-COOH sont lavées 3 fois dans solution tampon MES (0.1M, pH 5,0).

Le lavage consiste à mettre les microbilles en suspension dans un 1 ml de solution tampon, puis la suspension est centrifugée pendant 1min à 2000 rcf (relative centrifugal force) pour former un culot de microbilles, finalement le surnageant est retiré.

Une quantité de 50 μ g d'EDC est ajoutée avec 50 μ g de sulfo-NHS à 5 minutes d'intervalle. Le volume de réaction est ajusté à 1ml de solution tampon MES.

La réaction a lieu pendant 30 minutes à température ambiante sur le plateau tournant rotatif.

Après centrifugation, le surnageant est retiré et 3 lavages sont effectués de nouveau avec une solution tampon PBS IX.

2.2.1.2 Immobilisation de l'extrait d'allergène

Les microbilles ont été « activées », car nous avons formé des esters NHS qui sont réactifs aux groupes amines primaires. Ils réagiront directement avec un des nombreux groupes amines primaires que comporte la protéine par une réaction d'amidation : le groupe amine se substitue à l'ester NHS pour former une liaison covalente (figure 2.6).

La réaction d'immobilisation est réalisée dans une solution tampon PBS à pH 7.4 pendant 2 h. Ensuite, la réaction est arrêtée en utilisant une solution tampon 2-amino-2-hydroxyméthyl-1.3-propanediol appelé communément Tris à pH 11⁶². Elle aura pour effet d'arrêter la réaction en désactivant les esters NHS actifs restants via le groupe amine primaire de la molécule. Comme l'extrait de protéines est ajouté en excès par rapport aux nombres de molécules d'esters NHS formés sur les microbilles, il est considéré que le nombre de molécules Tris greffées est négligeable devant la quantité de protéines greffées sur la surface de la microbille PS.

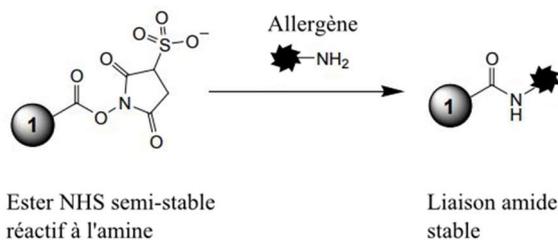


Figure 2.6 : Schéma décrivant la réaction entre l'ester sulfo-NHS et un groupe amine primaire de la protéine.

1) Immobilisation de l'allergène

Une quantité de 5 mg de protéines pour 10^7 microbilles est ajoutée dans 1 ml de solution tampon PBS 1X.

Le tout est incubé pendant 2 h sur le plateau tournant rotatif à température ambiante.

La suspension est centrifugée pendant 1 minute à 2000 rcf puis le surnageant est retiré.

2) Blocage de la réaction

Les microbilles sont remises en suspension dans un ml de solution tampon Tris 20mM pH 11 pendant 24h sur le plateau tournant rotatif à température ambiante.

3) Stockage de la réaction

La suspension est de nouveau centrifugée (1 min, 2000 rcf) pour retirer le surnageant et mettre les microbilles en suspension dans une solution tampon PBS-TBN 0.1 % (PBS 1X, 0.05 % Tween 20, BSA 0.1 % et sodium azide 0.1 %).

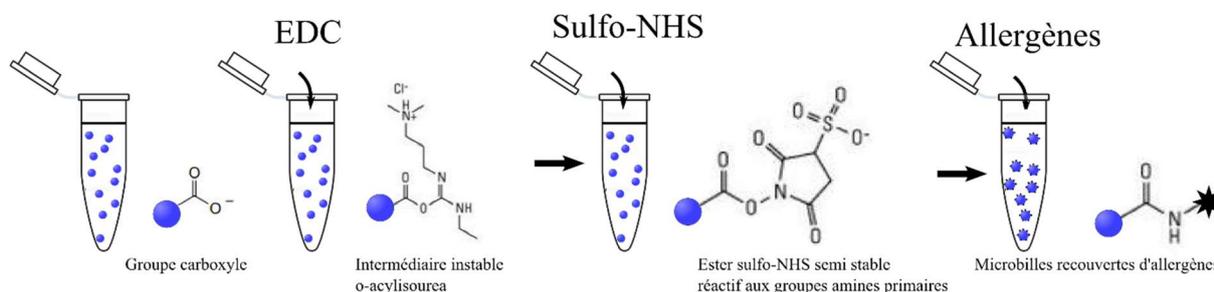


Figure 2.7 : Résumé chronologique du procédé de fonctionnalisation des microbilles polystyrènes.

2.2.1.3 Modélisation des sites de liaison des allergènes majeurs de l'arachide

Les groupes amines primaires favorables à la réaction d'amidation se trouvent sur des résidus d'acides aminés électropositifs. Seuls deux acides aminés correspondent à cette condition la Lysine (Lys) et l'Arginine (Arg). La figure 2.8 montre les structures tridimensionnelles des allergènes *Ara h 1*, *Ara h 2* et *Ara h 3* effectuées grâce au logiciel Chimera⁶³⁻⁶⁶. Ce logiciel permet la visualisation interactive, l'analyse des structures des molécules et le calcul de différentes grandeurs. Nous l'avons utilisé pour visualiser les structures tridimensionnelles des allergènes et pour localiser les résidus d'acides aminés électropositifs. La figure 2.8 indique la position des résidus d'acides aminés Arg (en bleu) et la position des résidus Lys (en violet). Premièrement, on remarque qu'ils sont disposés tout autour des allergènes. Deuxièmement, une étude comparative a été effectuée pour comparer le pourcentage de surface occupée par les résidus électropositifs par rapport à la surface totale de l'allergène. Il reste inchangé : 20 % pour

Ara h 1 et 21 % pour *Ara h 2* et *Ara h 3*, comme indiqué par le tableau 2.2. La structure tridimensionnelle des allergènes majeurs de l'arachide n'a pas d'influence sur le pourcentage de surface des allergènes pouvant créer des liaisons amides avec les microbilles PS. En considérant uniquement ce paramètre, les allergènes majeurs de l'extrait l'arachide se fixeront de la même manière sur les microbilles PS. Aucun allergène ne sera fixé de manière préférentielle due à un pourcentage de surface de réaction plus important.

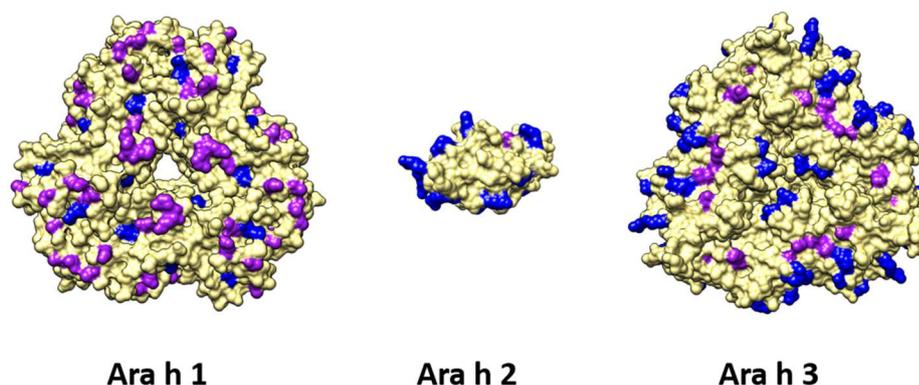


Figure 2.8 : Localisation des acides aminés électropositifs (Arginine en bleu et Lysine en violet) pour les allergènes majeurs de l'arachide *Ara h 1,2* et 3.

Allergènes	Surface total de l'allergène	Surface électropositive de l'allergène	Pourcentage de la surface électropositive par rapport à la surface total de l'allergène
<i>Ara h 1</i>	52 326 Å ²	10 762 Å ²	20 %
<i>Ara h 2</i>	6 700 Å ²	3 800 Å ²	21 %
<i>Ara h 3</i>	114 500 Å ²	24 300 Å ²	21 %

Tableau 2.2 : Tableau indiquant la surface totale, la surface électropositive et le pourcentage de cette dernière pour *Ara h 1, 2* et 3.

2.2.2 Biofonctionnalisation des microbilles superparamagnétiques

Nous avons choisi d'utiliser des microbilles SPM pour manipuler et séparer les particules PS qui ont réagi avec les sérums de celles qui n'ont pas réagi. Ce tri sera effectué à l'aide des microbilles SPM dynabeads® MyOne™ tosyl activated. Afin qu'elle puisse se fixer aux anticorps primaires IgE, nous devons réaliser une biofonctionnalisation de ces microbilles par des anticorps secondaire anti-IgE.

2.2.2.1 Immobilisation de l'anticorps secondaire

Ces particules SPM sont appelées « tosyl-activated » en raison du procédé de fonctionnalisation chimique effectué par le fabricant. Premièrement, elles ont été recouvertes d'une couche de polyuréthane. Puis les groupements hydroxyles ont été activés par une réaction avec du chlorure de p-toluènesulfonyl (Tosyle) pour produire un ester sulfonyl prêt à réagir avec des protéines,

selon le schéma de réaction présenté sur la figure 2.9. Ce groupement chimique permet une réaction douce pour créer une liaison covalente en orientant l'anticorps secondaire avec la partie variable (site de reconnaissance de l'anticorps primaire) vers l'extérieur de la microbille⁶⁷.

Nous avons réalisé des fonctionnalisations avec des anticorps secondaires anti-IgE et anti-IgG pour préparer les réactions de tri magnétique avec les anticorps primaire IgE et IgG.

1) Immobilisation de l'allergène

Les particules SPM (1 μm) sont lavées trois fois dans une solution tampon de sodium phosphate à pH 7.4. Pour les microbilles SPM, le lavage consiste à mettre les microbilles en suspension dans un 1 ml de solution tampon, puis le microtube contenant la suspension est mise en contact avec un aimant permanent. Au bout d'une minute, le surnageant est retiré.

La solution d'anticorps (40 μg d'anticorps pour 1 mg de microbilles) est ajoutée et un volume solution tampon de sodium phosphate est ajoutée pour ajuster le volume de réaction à 1 ml. L'ensemble est incubé pendant 48 h à température ambiante. Selon le fabricant, c'est à l'issue de ce temps de réaction que les performances du procédé de biofonctionnalisation sont maximales.

2) Blocage de la réaction

Selon le même procédé les microbilles SPM sont lavées trois fois avec une solution tampon Tris 20mM pH 11. Puis, un volume d'un ml de cette solution tampon est ajoutée, l'incubation dure 24 h à température ambiante. La solution Tris va neutraliser les esters sulfonyles n'ayant pas réagi avec un anticorps.

3) Stockage de la réaction

Un aimant permanent est appliqué pendant une minute afin de retirer le surnageant. Les microbilles sont remises en suspension dans une solution de TBN 0.1 % (PBS 1X, Tween 20 à 0.05 %, BSA à 0.1 % et NaN_3 à 0.01 %) pour une conservation optimale d'1 mois.

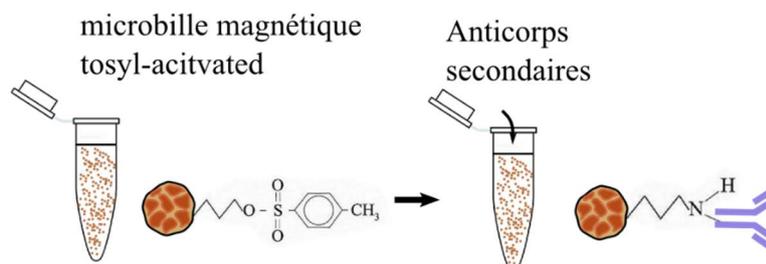


Figure 2.9 : Schéma réactionnel de la bio-fonctionnalisation des microbilles superparamagnétiques par des anticorps secondaires.

2.2.3 Dispositif expérimental

Afin de réaliser la biofonctionnalisation et sa caractérisation, nous avons choisi d'utiliser le dispositif expérimental montré sur la figure 2.10.

Différentes solutions tampon permettront de stabiliser le pH lors de la réaction malgré l'ajout d'acide ou de base ou lors des dilutions ainsi que d'ajout de précurseurs. Les solutions seront préparées en utilisant des micropipettes de différents calibres ainsi qu'une balance de précision pour peser des poudres avec une précision d'un dixième de mg. Lors des différentes réactions, nous placerons les microtubes sur un plateau tournant pour générer une agitation mécanique afin d'éviter que les microbilles sédimentent. Une centrifugeuse et un aimant permanent seront

utilisés pour isoler les microbilles et changer de solution tout en minimisant les pertes de microbilles à chaque fois qu'une étape de lavage devra être réalisée. Un microscope optique est à notre disposition pour visualiser les microbilles par fluorescence afin de caractériser la bio-fonctionnalisation des microbilles SPM.

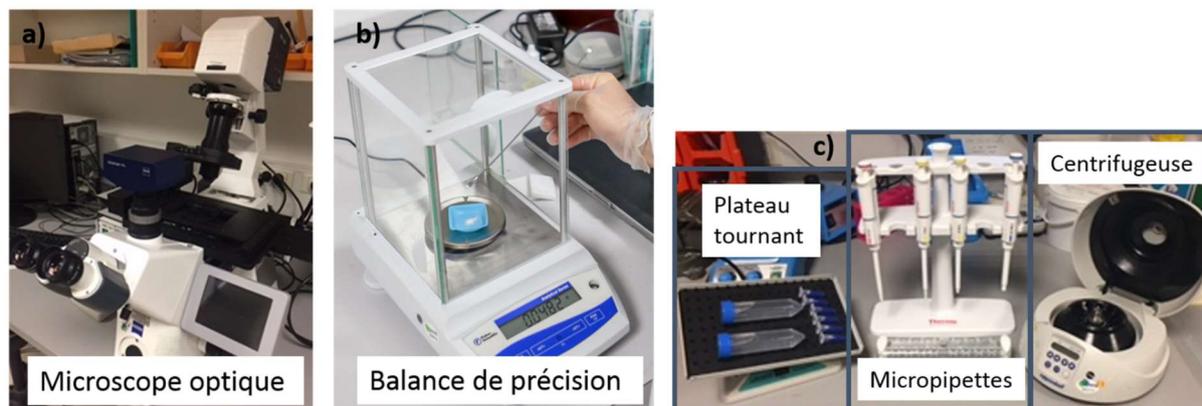


Figure 2.10 : Dispositif expérimental utilisé pour la bio-fonctionnalisation. a) microscope optique, b) balance de précision, c) plateau tournant rotatif, micropipettes de différents calibres et une centrifugeuse.

Les réactions de greffage auront lieu dans des microtubes Eppendorf® Protein LoBind dont les parois sont en polypropylène pour limiter l'adsorption de protéines⁶⁸ (figure 2.11).



Figure 2.11 : Photo de microtubes Eppendorf® 0.5, 1.5 et 2ml. Photo du fournisseur SigmaAldrich®.

Notre partenaire de Toulouse nous a mis à disposition ses équipements et son expertise afin de procéder aux caractérisations de bio-fonctionnalisation par méthode BCA et « microbilles blot » (voir section 2.3.1). Dans un premier temps, les microbilles PS ont été fonctionnalisées avec des allergènes et dans un deuxième temps, les microbilles SPM ont été fonctionnalisées avec des anticorps secondaires fluorescents.

Un protocole de bio-fonctionnalisation des microbilles PS a été développé par chimie « cross-linking » en 2 étapes. Premièrement, les groupes carboxyles sont activés par la réaction des réactifs : EDC et sulfo-NHS. Puis les allergènes sont immobilisés à la surface avec la formation d'une liaison covalente entre le groupe COOH de la microbille et un groupe amine primaire de la protéine d'intérêt. Les positions des sites potentiels de

fixation de l'allergène avec la microbille ont été modélisées avec les trois allergènes majeurs de l'arachide : Ara h1, Ara h2 et Ara h3. Nous avons validé le protocole de bio-fonctionnalisation des microbilles SPM fourni par Dynabeads. Les anticorps secondaires sont greffés directement sur la surface avec la bonne orientation (site de reconnaissance de l'antigène vers l'extérieur de la microbille). Un dispositif expérimental dédié à la biofonctionnalisation a été décrit.

2.3 Caractérisation de la biofonctionnalisation

L'étape de caractérisation est primordiale, car elle permet de contrôler, de quantifier la biofonctionnalisation et de s'assurer que les allergènes sont toujours reconnus par les anticorps.

2.3.1 Microbilles polystyrènes

Pour caractériser la fonctionnalisation de ces microbilles, nous avons utilisé deux stratégies. La méthode dite « BCA (BiCinchoninic acid Assay) » permet de quantifier la quantité de protéines à la surface des microbilles puis une méthode « microbille blot » pour vérifier que les allergènes n'ont pas été dénaturés et qu'ils sont toujours reconnus par des sérums de patient allergique (sérum contenant des anticorps spécifiques reconnaissant les allergènes présents à la surface de la microbille).

2.3.1.1 Méthode BCA

Un dosage indirect BCA a été réalisé pour mesurer la quantité d'allergènes immobilisés à la surface des microbilles PS. C'est une méthode colorimétrique de détection et de quantification des protéines contenues dans un échantillon en utilisant l'acide Bicinchoninique. Elle repose sur le principe connu de la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{1+} par une protéine dans un milieu basique. La réaction de coloration violette apparaît grâce à la formation d'un complexe de 2 molécules de BCA avec un ion Cu^{1+} (figure 2.12a). Ce complexe soluble dans l'eau montre une grande absorption à 562 nm (violet). L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en protéine sur une gamme de concentration indiquée par le fabricant. La figure 2.12b montre la variation de coloration de solution de protéines à différentes concentrations (0 – 40 $\mu\text{g/ml}$) après la réaction BCA.

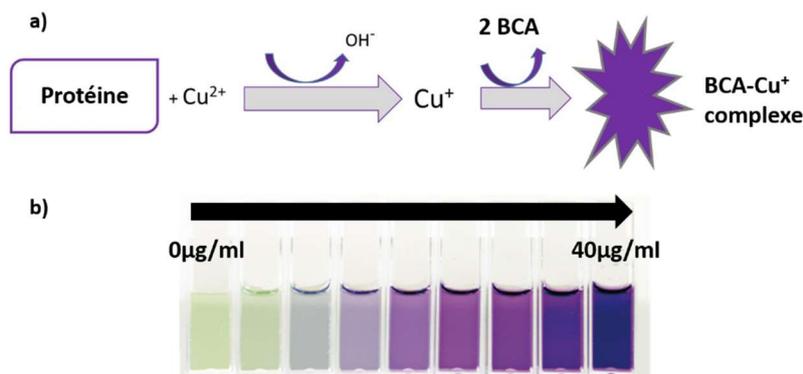


Figure 2.12 : a) Schéma de la réaction de réduction des ions Cu²⁺ en Cu⁺ et de la réaction de complexation responsable de la couleur apparente violette et de l'absorbance à 562nm. b) résultats du test BCA sur les solutions de référence (0 – 40µg/ml).

Les dosages de concentration d'allergènes par colorimétrie ont été réalisés avec le kit de dosage de protéine : « Micro BCATM Protein Assay Kit » acheté auprès de l'entreprise Thermo ScientificTM. Ce kit mesure la concentration de protéines en solution dans une gamme de concentration faible (2 – 40µg/ml). Nous avons utilisé un spectrophotomètre pour réaliser les mesures d'absorbance en solution. Une courbe de calibration de l'absorbance doit être réalisée avec des solutions de protéines BSA de références fournis dans le kit. Les concentrations des solutions de référence sont : 0, 1, 5, 10, 20 et 40µg/ml. On considère que la nature des protéines n'influe pas sur l'absorbance final du test BCATM. Après avoir tracé la courbe de calibration en rouge sur la figure 2.14 l'absorbance des échantillons à analyser est mesurée puis reportée sur la courbe de calibration pour évaluer la concentration en protéines. En vue de caractériser la fonctionnalisation, nous avons réalisé un test avant et après la fonctionnalisation en allergènes de 10⁵ microbilles polystyrènes comme l'indique le schéma de la figure 2.13. En premier lieu, un test BCATM a été réalisé pour évaluer la concentration de protéines contenues dans l'extrait d'allergènes qui sera utilisé pour la fonctionnalisation. La biofonctionnalisation est réalisée et les microbilles sont stockées, puis l'extrait d'allergènes utilisé est récupéré afin de réaliser un second test BCATM. Ce deuxième test évalue la quantité de protéines qui ne s'est pas greffée sur les microbilles. La différence de concentration de protéines mesurée entre ces deux tests nous permet d'évaluer la quantité de protéines qui s'est fixées par microbille PS.

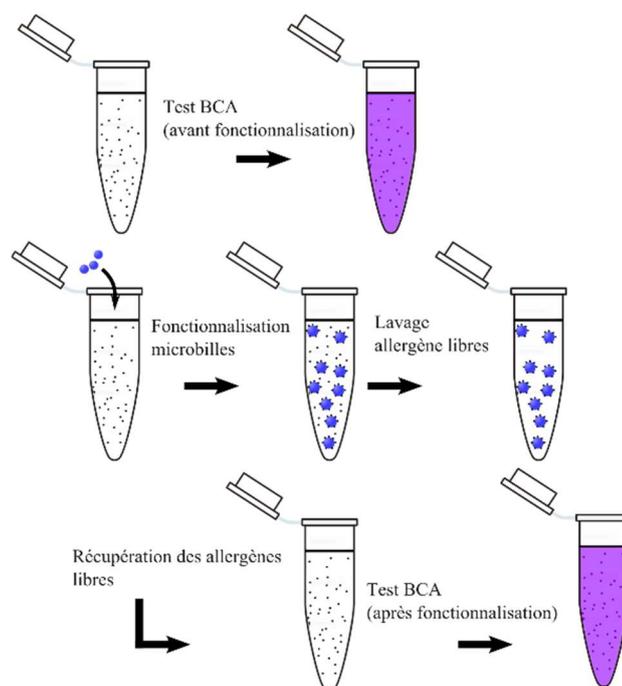


Figure 2.13 : Descriptif du dosage différentiel de la concentration d'allergènes greffés à la surface des microbilles polystyrènes en réalisant deux tests colorimétriques BCA : sur la solution d'allergènes qui sera utilisée pour le greffage et sur le surnageant après le procédé de greffage.

Les résultats sont présentés sur la courbe de la figure 2.14, les mesures d'absorbances (A) à 562 nm sont représentées en fonction de la concentration en protéine de BSA (C_{prot}). L'absorbance a été modélisée par régression linéaire (en rouge) en utilisant le logiciel OriginPro 8.

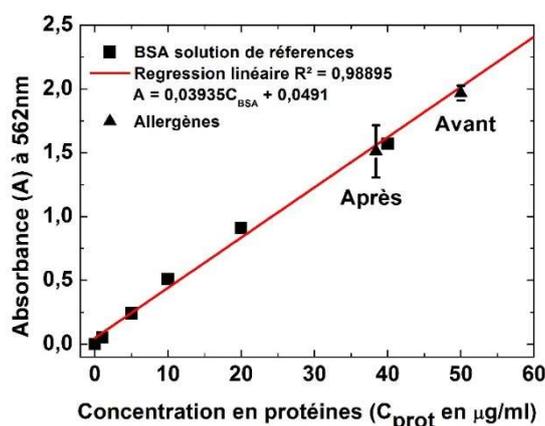


Figure 2.14 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance à 562 nm en fonction de la concentration de protéine.

Un volume de 150 μl d'une solution de protéines de concentration connue (solution de référence) ou à déterminer sont ajoutés à 150 μl de la solution WR « working reagent ». Composition de la solution WR : 25 volumes de réactif A, 24 volumes de réactif B et 1 volume de réactif C.

Le réactif A est une solution tampon basique, le réactif B contient l'acide bichoninique (BCA) et le réactif C est une solution de sulfate de cuivre qui contient les ions cuivre Cu^{2+} . L'ensemble est incubé pendant 2 h à 37°C (zone de travail 2 – 40 $\mu\text{g/ml}$). Puis la solution est refroidie à la température ambiante. Finalement, l'absorbance de chaque solution est mesurée en respectant une durée maximale de 10 min entre la première et la dernière mesure.

Les résultats sont reportés sur un histogramme (figure 2.15). Avant la fonctionnalisation, la quantité de protéines mesurée est de $50 \pm 1.48 \mu\text{g}$. Après la fonctionnalisation, la quantité de protéines n'ayant pas réagi est évaluée à $38.4 \pm 5.21 \mu\text{g}$. Donc la quantité de protéines greffées sur les microbilles est $11.6 \pm 6.69 \mu\text{g}$.

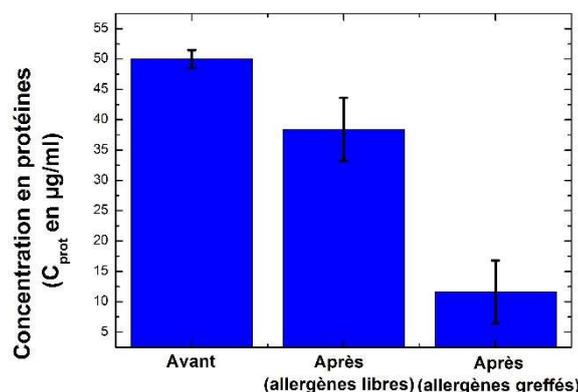


Figure 2.15 : Graphique présentant les résultats des deux dosages BCA et la différence calculée représentant la quantité d'allergènes fixés.

Pour effectuer une comparaison, nous allons calculer la masse théorique d'allergènes qui se fixe sur 10^5 microbilles. Il a été supposé qu'un allergène greffé occupe une aire de 25 nm^2 et que toute la surface de la microbille est recouverte d'une seule couche d'allergènes.

Le nombre de protéines greffées par microbille est égal au ratio de l'aire de la microbille A_m sur l'aire occupé par une protéine A_p estimé à 25 nm^2 .

$$N_{p/m} = \frac{A_m}{A_p} \quad (2.1)$$

Le nombre total de protéines greffées sur 10^5 microbilles $N_{p,\text{tot}}$ est ainsi calculé selon l'équation 2.1.

$$N_{p,\text{tot}} = N_{p/m} * 10^5 \quad (2.2)$$

La masse de protéine théorique m_p qui se fixe sur 10^5 microbilles est égale à

$$m_p = \frac{N_{p/m} * M_p}{N_A} \quad (2.3)$$

N_A constante d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), M_p masse molaire de la protéine (estimée à $50\,000 \text{ g/mol}$ pour l'arachide).

En utilisant la relation (2.3) la masse théorique est de 64.8 ng si l'on considère uniquement un enrobage monocouche autour de la microbille. Cette expérience montre que les protéines se greffent bien à la surface des microbilles polystyrènes, car la masse mesurée est non

négligeable. Cependant, la quantité théorique (64.8 ng) est beaucoup plus faible que la quantité mesurée (11.6 µg). Pour expliquer ce résultat, on peut supposer que les allergènes, et/ou d'autres composés absorbant à 562 nm qui sont présents au sein de la suspension se greffent sur les microsphères en formant des multicouches.

2.3.1.2 Test « microbilles blot »

Les allergènes sont maintenant immobilisés à la surface des microbilles, mais nous devons nous assurer qu'ils ont gardé leur fonction de reconnaissance. C'est leur conformation tridimensionnelle qui permet leur reconnaissance par les anticorps spécifiques IgE via une liaison clé – serrure. En effet, si les allergènes sont trop serrés entre eux à la surface de la microbille, la structure tridimensionnelle des protéines sera modifiée par contraintes stériques et la reconnaissance des allergènes par les anticorps sera altérée.

Nous allons procéder à une technique dite « microbilles blot », réalisé avec l'équipe BIOCID du laboratoire Pharma-Dev de l'université Paul Sabatier à Toulouse, lors d'une semaine d'expériences communes. Le principe de cette expérimentation est le suivant : des microbilles sont déposées sur une membrane de nitrocellulose puis mises en contact avec du sérum de patient contenant des anticorps IgE réactifs aux allergènes fixés sur la surface de la microbille. La réaction a lieu pendant 2 h à température ambiante. Puis la membrane est rincée à l'aide d'une solution tampon de PBS 1X. Nous déposons une goutte de solution d'anticorps secondaire marquée à un enzyme sur l'ensemble membrane-microbilles. Ces anticorps permettront la détection et la visualisation par chimiluminescence, Cf figure 2.16.

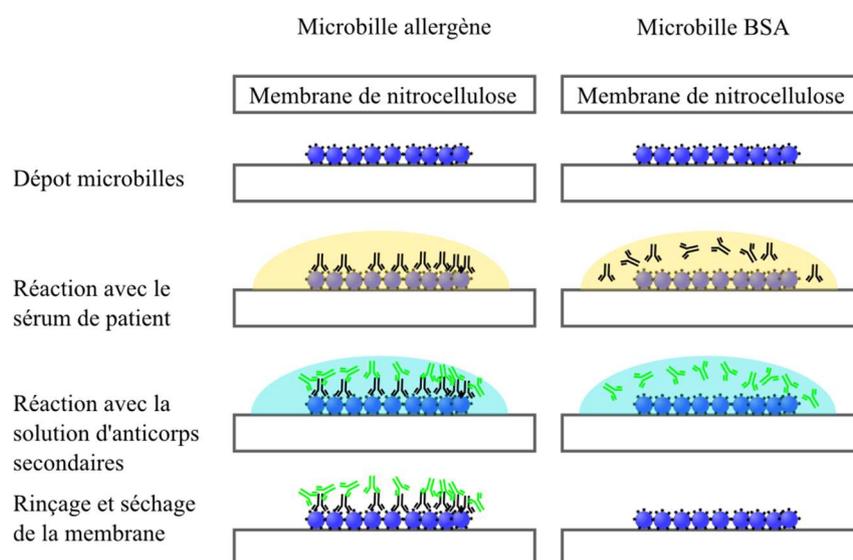


Figure 2.16 : Schéma du principe de révélation des anticorps spécifiques IgE par chimiluminescence sur une membrane de nitrocellulose.

Les sérums de patient utilisés présentent des concentrations en anticorps IgE variables : faible (1 UI/ml), moyenne (10 UI/ml) et forte concentration (100 UI/ml). Les microbilles arachide et noisette sont mises en contact avec les sérums de patient allergiques à l'arachide et à la noisette. Nous avons également effectué des tests de contrôle, des microbilles fonctionnalisées aux protéines BSA (non-réactives aux différents sérums de patients). Les différentes conditions sont récapitulées et indiquées par une croix sur le tableau 2.3.

Chaque condition est effectuée deux fois, sur un « spot » de microbilles déposées sur la membrane. La révélation par chimiluminescence se traduit par une tâche noire à l'endroit du dépôt de microbilles qui traduit une présence importante d'anticorps secondaire. L'absence de tâche signifie une absence d'anticorps secondaire et par conséquent une absence d'anticorps spécifique IgE. Plus la tâche sera sombre, plus la quantité d'anticorps mise en évidence est importante. En utilisant ce procédé, il est possible de réaliser des tests comparatifs.

Sérum patient allergique	de	Concentration en IgE (UI/ml)	Microbilles arachide	Microbilles noisette	Microbilles BSA (contrôle)
Arachide		Faible (1)	X		X
		Moyen (10)	X		X
		Fort (100)	X		X
Noisette		Faible (1)		X	X
		Moyen (10)		X	X
		Fort (100)		X	X

Tableau 2.3 : Récapitulatif des 12 conditions différentes (microbilles + sérums de patient) utilisées, chaque croix correspond à une condition utilisée.

Les résultats sont présentés sur la figure 2.17, la différence de signal entre les microbilles allergènes et les microbilles témoins (BSA) est significative pour les sérums de l'allergie à la noisette et pour les sérums moyens et fort de l'allergie à l'arachide. Les résultats ne permettent pas de discriminer le sérum moyen et le sérum fort pour l'allergie à la noisette.

	Sérum faible	Sérum moyen	Sérum fort
Microbilles arachides + sérum positif à l'arachide			
Microbilles BSA + sérum positif à l'arachide			
Microbilles noisettes + sérum positif à la noisette			
Microbilles BSA + sérum positif à la noisette			

Figure 2.17 : Résultats des expériences sur membranes de nitrocellulose avec des sérums positifs à l'allergie à l'arachide et à la noisette à 3 niveaux de concentrations en IgE spécifiques. Des microbilles tests (arachide et noisette) et BSA (témoins) ont été utilisées.

Nous attribuons ces anomalies au caractère non-quantitatif de l'expérience mise en place. La présence d'un signal faible pour les microbilles BSA révèle des interactions non-spécifiques BSA – anticorps IgE. Cependant, les signaux des microbilles témoins observés sont négligeables par rapport aux signaux des microbilles allergènes pour les sérums moyens et forts. Une présence importante d'anticorps spécifiques a été révélée pour les sérums de patient à moyenne et forte concentration. Ces anticorps spécifiques ont alors reconnu les allergènes de

l'arachide et de la noisette immobilisés sur la surface des microbilles. Les allergènes fonctionnalisés ont donc gardé leur capacité à être reconnus par le système immunitaire bien que contraints par des liaisons covalentes.

2.3.2 Microbilles magnétiques

Le protocole de biofonctionnalisation de surface des microbilles SPM a été validé par révélation des anticorps secondaire à la fluorescence FITC. En effet, les anticorps secondaires utilisés lors du greffage sont marqués à la FITC, ainsi les microbilles SPM deviennent fluorescentes après l'étape de greffage (figure 2.18). Les dérivés de la fluorescéine sont les plus utilisés en recherche biologique en raison de leur grande capacité d'absorption et leur grande solubilité dans l'eau. Cette molécule présente un maximum d'excitation à la longueur d'onde de 490 nm et un maximum d'émission à la longueur d'onde de 525 nm.

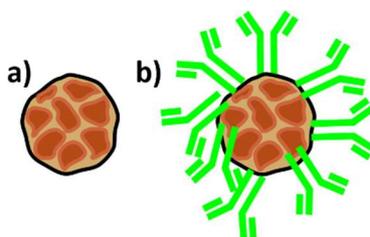


Figure 2.18 : Schéma des microbilles a) sans fonctionnalisation b) avec fonctionnalisation des anticorps fluorescents.

Tout d'abord, les microbilles magnétiques sont fonctionnalisées avec des anticorps secondaires en utilisant le protocole énoncé dans la partie 2.2.2. Les microbilles sont lavées pour retirer l'excédent d'anticorps secondaires n'ayant pas réagi, un petit volume de suspension de microbilles est déposé sur une lame de verre puis est visualisé par fluorescence à l'aide d'un microscope optique de fluorescence.

L'image microscope (figure 2.19) montre que les microbilles SPM apparaissent vertes ce qui révèle la présence des anticorps secondaires marqués FITC. En effet, la longueur d'onde d'émission du FITC est de 525 nm ce qui correspond à la couleur verte. Les particules sont bien recouvertes d'anticorps fluorescents FITC et l'on conclut que le greffage des microbilles par les anticorps secondaire anti-IgE s'est produit correctement.

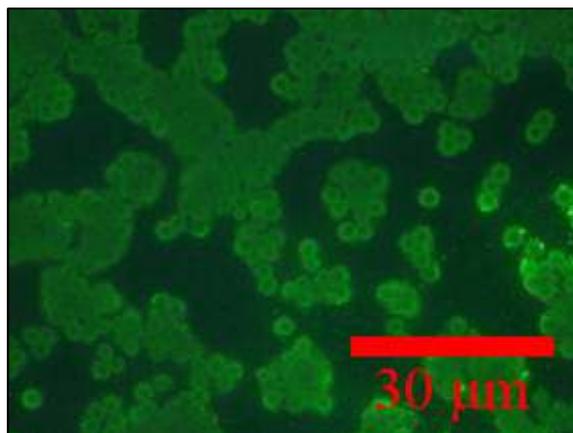


Figure 2.19 : Microbilles magnétiques observées mise en évidence des anticorps secondaires par microscopie à fluorescence.

Nous avons mis en place plusieurs stratégies de caractérisation pour mettre en évidence la réussite des réactions de greffage tel que la méthode BCA, une technique de « microbille blot » et une technique de visualisation des anticorps par fluorescence des anticorps secondaires. Nous avons caractérisé le greffage des allergènes par la méthode BCA et la méthode « microbille blot ». La méthode BCA a permis de quantifier la quantité d'allergène fixée par microbilles alors que la deuxième technique a confirmé que les sérums de patient réagissent normalement avec les allergènes situés sur la surface des microbilles PS malgré la liaison covalente. La microscopie par fluorescence a révélé qualitativement la présence des anticorps secondaires, marqués FITC, sur la surface des microbilles SPM après le procédé de biofonctionnalisation.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre, deux protocoles de biofonctionnalisation ont été développés, d'une part pour les microbilles PS et d'autre part pour les microbilles SPM. Les différentes caractérisations nous ont permis de mettre en valeur la fixation des ligands à la surface des microbilles et la conservation de leurs propriétés immunologiques.

Les microbilles PS ont une réponse magnétique très faible (matériau diamagnétique). Elles mesurent 10 μm de diamètre et sont pigmentées pour permettre une discrimination optique optimale. La fonctionnalisation de surface par des groupes carboxyles autorise la formation d'une liaison covalente avec des protéines. Les microbilles SPM dynabeads® MyOne™ tosyl-activated sont particulièrement adaptées pour notre application en raison de leur réponse et leur manipulation avec un aimant permanent.

Des anticorps secondaires anti-IgE et anti-IgG ont été fonctionnalisés à la surface des microbilles Dynabeads®. Nous avons mis en place un dispositif expérimental permettant de réaliser toutes les étapes du protocole expérimental.

Le schéma de fonctionnalisation utilisé est une réaction d'activation des groupes COOH par « cross-linking » en produisant un ester NHS favorablement réactif aux groupements amine

d'une protéine. Une étude numérique a été réalisée pour connaître les potentiels sites de fixation des 3 allergènes majeurs de l'arachide sur la microbille.

La fonctionnalisation a été caractérisée par la méthode Pierce™ BCA qui a montré que les protéines se sont bien greffées à la surface des microbilles. Puis nous avons vérifié que les allergènes présents sur la microbille ont gardé leur fonction de reconnaissance des anticorps primaire IgE par une méthode dite de « microbille blot ».

Les microbilles SPM possèdent des esters sulfonyles attachés à leur surface ce qui permet de créer une liaison covalente avec des anticorps secondaire anti-IgE. La présence des anticorps secondaires marqués au FITC par microscopie à fluorescence atteste la réussite de la biofonctionnalisation. Nous avons décrit le procédé de biofonctionnalisation des microbilles nécessaires pour la réaction avec le sérum d'une part et le tri magnétique d'autre part. En effet, les microbilles PS fonctionnalisées avec les allergènes seront utilisées pour la réaction avec le sérum de patient. Tandis que les microbilles SPM seront employées pour effectuer la séparation magnétique afin d'isoler les microbilles polystyrènes qui se sont recouvertes d'IgE spécifique durant l'étape précédente. Dans le prochain chapitre, nous étudierons le fonctionnement, le dispositif expérimental et les performances du tri magnétique qui constitue la deuxième technologie à développer pour apporter la preuve de concept de notre application biomédicale.

Chapitre 3 : Développement d'une technologie de tri magnétique appliqué aux microbilles

3.1 Introduction au magnétisme	60
3.1.1 Le différentes catégories de matériaux magnétiques.....	60
3.1.2 Le superparamagnétisme	62
3.1.3 Les microbilles superparamagnétiques.....	63
3.2 Principe théorique	65
3.2.1 Magnétophorèse et force magnétique	65
3.2.2 Séparation magnétique	66
3.3 Mise en place du dispositif expérimental	69
3.3.1 Les séparateurs magnétique	69
3.3.2 Mesure de la vitesse magnétophorétique et de la force magnétique des microbilles SPM	70
3.3.3 Mise en évidence du phénomène d'agglomération des microbilles SPM	72
3.3.4 Protocole détaillé du tri magnétique	73
3.4 Performances du tri magnétique	76
3.4.1 Influence de la taille des microbilles	76
3.4.2 Influence de la quantité des microbilles	77
3.4.3 Influence du temps de réaction	79
3.4.4 Evolution du tri magnétique en fonction de la concentration d'anticorps primaires...	79
3.5 Conclusion	82

Le chapitre 2 a traité du greffage covalent des protéines d'intérêt (allergènes et anticorps secondaires) sur la surface des microbilles. Grâce à cette biofonctionnalisation, les microbilles PS réagissent avec les anticorps primaires contenus dans le sérum de patient, représenté sur la figure 3.1. Ainsi, les microbilles PS qui se sont recouvertes d'anticorps par reconnaissance spécifique sont dites « positives » (bleu et vert), elles ont réagi avec le sérum. Alors que celles non recouvertes sont dites « négative » (rouge) se traduisant par une absence de réaction avec le sérum. Puis les microbilles SPM et PS formeront des complexes via les anticorps primaires qui établissent une liaison avec l'allergène d'une part et l'anticorps secondaire d'autre part. L'objectif du tri magnétique est de séparer ces deux catégories de microbilles.

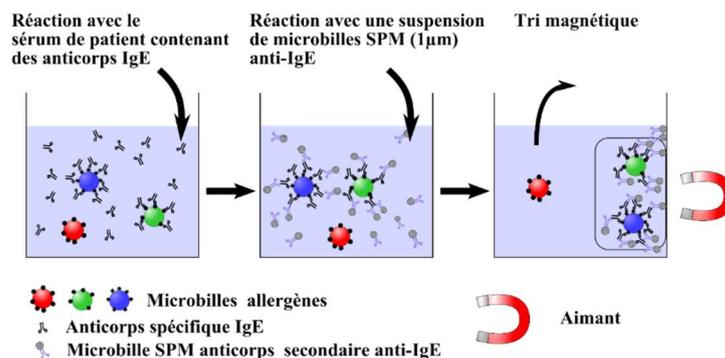


Figure 3.1 : Schéma de principe du tri magnétique de microbilles.

Dans un premier temps, les propriétés de magnétisme et de superparamagnétisme seront décrites. Nous verrons comment des particules micrométriques possèdent la propriété de superparamagnétisme.

Dans un deuxième temps, les principes physiques de la magnétophorèse et du tri magnétique seront détaillés.

La troisième partie sera consacrée à la mise en place du dispositif expérimental, les dimensions et morphologie des aimants seront discutées.

Dans la quatrième partie, le tri magnétique sera caractérisé en effectuant la comparaison avec différentes tailles de microbilles et variant la distance à l'aimant. Une étude des points de fonctionnement (dilution du sérum, quantité de microbilles PS/SPM, et temps de réaction) sera effectuée.

Dans la dernière partie, nous étudierons l'influence de 4 paramètres (taille des microbilles, quantité de microbilles, temps de réaction avec le sérum et la concentration d'anticorps primaires) sur l'efficacité du tri magnétique pour une optimiser de l'efficacité de la technologie.

3.1 Introduction au magnétisme

Le tri magnétique constitue une étape cruciale pour notre application. Il a été longuement étudié et est très utilisé pour la séparation de cellules^{54,55,69-71} (voir chapitre 1), cependant son usage appliqué au tri de particules est beaucoup plus rare^{34,72}. Nous montrerons que cette technologie est appropriée pour un usage sur des microbilles. Puis, le protocole de tri magnétique de cellules sera adapté pour obtenir un protocole expérimental optimisé et dédié au tri magnétique de microbilles PS. Nous chercherons à savoir si la faible concentration des anticorps IgE peut être mise en évidence avec cette méthode.

3.1.1 Les différentes catégories de matériaux magnétiques

Il existe cinq catégories de matériaux magnétiques dont le comportement varie en présence d'un champ magnétique.

Dans un matériau, le spin d'un électron crée un moment magnétique, appelé moment magnétique de spin. Des interactions purement quantiques dues aux spins des électrons tendent à orienter les moments magnétiques de manière parallèle ou antiparallèle en fonction du type de matériau magnétique. De plus, les moments magnétiques peuvent interagir avec un champ magnétique externe, soit en s'y opposant, soit en s'alignant avec celui-ci, selon la nature magnétique du matériau. Plus le champ magnétique externe est puissant, plus il y aura d'électrons qui orienteront leur spin en fonction de celui-ci.

On définit alors la susceptibilité magnétique du matériau χ_m , qui est la facilité avec laquelle un matériau réagit en fonction du champ magnétique externe appliqué. Par conséquent, le matériau acquiert une aimantation M , qui dépend du champ magnétique externe appliqué B_0 et de la susceptibilité du matériau indiqué par la relation 3.1.

$$M = \chi_m B_0 \quad (3.1)$$

Plus la susceptibilité d'un matériau est élevée plus il obtiendra une aimantation importante.

Lorsque la susceptibilité est négative, l'aimantation est opposée au champ magnétique externe, le matériau est repoussé. A l'inverse, l'aimantation sera alignée dans la même direction pour une susceptibilité positive, le matériau est alors attiré.

Les matériaux sont classés en cinq catégories⁷³ (figure 3.2) qui définissent leurs comportements lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique. Il existe d'une part les matériaux ayant la capacité de former des domaines magnétiques spontanément. D'autre part, les matériaux qui n'ont pas cette capacité mais dont le moment magnétique global s'oriente en présence d'un champ magnétique externe. Ces matériaux possèdent une susceptibilité plus faible que pour les matériaux qui s'orientent spontanément.

Dans un matériau ferromagnétique, les moments sont alignés dans la même direction. La susceptibilité est positive et très élevée (~ 100). Le ferromagnétisme (qui inclut le ferrimagnétisme) génère les champs les plus importants et crée des forces suffisamment importantes pour être ressenti et est responsable du phénomène de magnétisme des aimants.

Les trois autres mécanismes (diamagnétisme, paramagnétisme et antiferromagnétisme) génèrent des forces beaucoup plus faibles.

Certains matériaux magnétiques forment des domaines magnétiques spontanément. Dans un matériau antiferromagnétique, les moments sont antiparallèles. C'est également le cas pour un matériau ferrimagnétique cependant les moments d'amplitude différents génèrent un moment magnétique résultant non-nul contrairement au matériau antiferromagnétique.

Un matériau diamagnétique ne présente aucun domaine ou ordres magnétiques néanmoins le moment total s'aligne dans la direction opposée du champ magnétique externe. Un matériau paramagnétique ne présente pas d'ordre, mais possède une aimantation alignée avec le champ magnétique. Ces deux matériaux réagissent très peu aux champs externes, car ils possèdent une susceptibilité magnétique très faible ($\chi_m \sim 10^{-5}$).

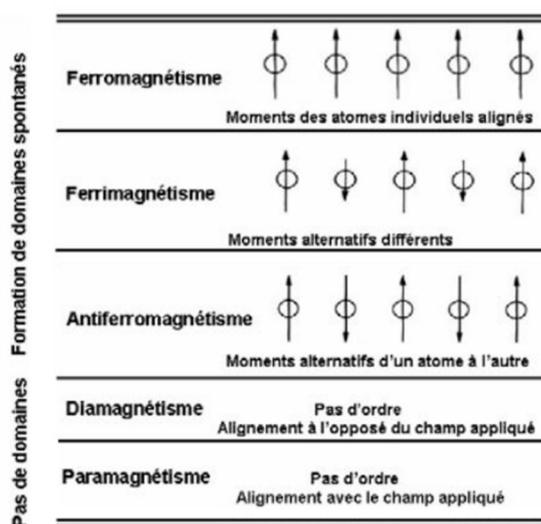


Figure 3.2 : Schéma récapitulatif des 5 classes de comportements magnétiques : ferromagnétisme, ferrimagnétisme, antiferromagnétisme, ferrimagnétisme et diamagnétisme¹¹⁰.

Le graphique de la figure 3.3 décrit l'aimantation d'un matériau ferromagnétique en fonction du champ appliqué. Il possède une aimantation de saturation M_S lorsque tous les moments individuels sont alignés avec le champ externe. Il présente une aimantation rémanente M_R correspondant à l'aimantation du matériau en l'absence de champ appliqué. Le champ coercitif

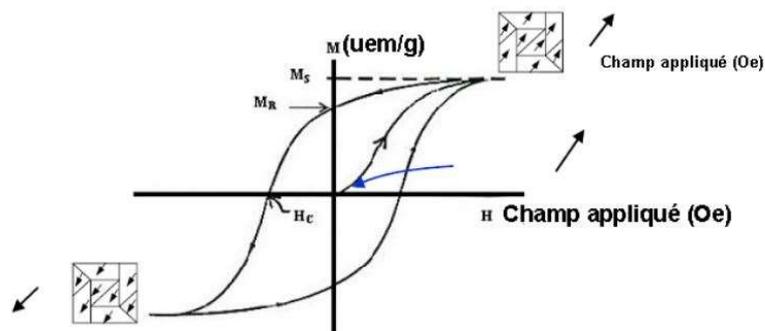


Figure 3.3 : Cycle d'hystérésis d'un matériau ferromagnétique¹¹⁰.

(H_C) est la valeur du champ externe lorsque l'aimantation du matériau s'annule. Lorsque l'on applique un champ magnétique externe sur un matériau ferromagnétique, les moments magnétiques s'orientent dans la même direction que le champ. Par la suite, même lorsque le champ est supprimé, une partie de l'alignement est conservée : le matériau s'est aimanté. En appliquant un champ magnétique opposé suffisamment intense, les moments magnétiques s'inversent, mais l'aimantation ne suit pas le chemin initial.

3.1.2 Le superparamagnétisme

Le superparamagnétisme⁷⁴ est une forme de magnétisme inhérent aux nanoparticules ferromagnétiques et ferrimagnétiques de très petites tailles.

En effet, plus la particule est petite plus cela requiert de l'énergie d'obtenir une configuration multidomaine ; en dessous d'un certain diamètre critique ($d < 28$ nm pour l'oxyde de fer), tous les moments s'alignent : on parle de configuration monodomaine. Pour une nanoparticule monodomaine, les moments sont tous parallèles, l'aimantation de la particule est assimilée à un moment géant dit « macrospin ». Si l'objet possède une anisotropie uniaxiale (résultat de la forme ou de la structure cristalline), le moment possède deux configurations stables : parallèle et antiparallèle à la direction définie par l'anisotropie (axe facile d'aimantation). Ces deux états sont séparés par une barrière énergétique KV produit de l'anisotropie magnétique K par le volume de la particule V . Le moment magnétique oscille spontanément entre ces deux configurations avec un temps caractéristique τ_n , (temps de relaxation de Néel) définie par l'équation 3.2^{75,76}:

$$\tau_n = \tau_0 e^{\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} = \tau_0 e^{\left(\frac{KV}{k_B T}\right)} \quad (3.2)$$

τ_0 est le temps de relaxation critique ($\sim 10^{-9}$ s), k_B est la constante de Boltzmann et T est la température. Si le temps de relaxation est grand par rapport à notre temps de mesure, le moment a peu de probabilité de se retourner : on parle de moment « bloqué » et de ferromagnétisme. Si en revanche ce temps est court par rapport au temps de mesure, le moment de la particule oscillera au cours de la mesure et le moment résultant sera nul : on parle alors de superparamagnétisme.

Lorsque la particule a un diamètre supérieur au diamètre critique, le moment est bloqué et le mécanisme résultant est le ferromagnétisme (figure 3.4a). Lorsque le diamètre de la particule est inférieur au diamètre critique, le moment de la particule oscille suivant l'axe facile générant le phénomène de superparamagnétisme (figure 3.4b). Dans ce cas, il n'y a pas de phénomène d'hystérésis et le moment magnétique est nul en l'absence de champ magnétique externe.

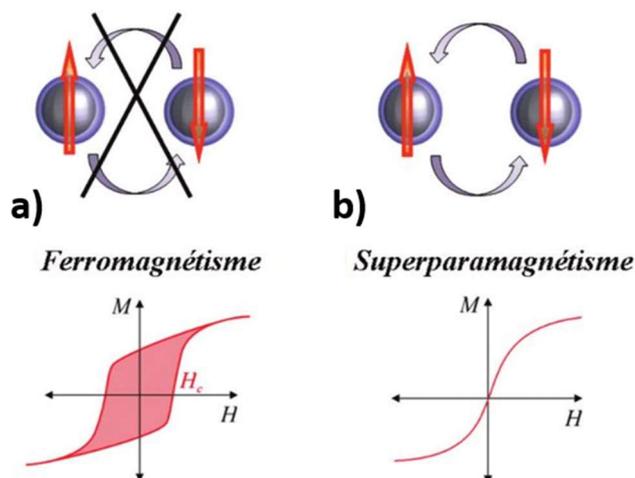


Figure 3.4 : Diagramme d'aimantation en fonction du champ appliqué pour une particule ferromagnétique et superparamagnétique¹¹¹.

3.1.3 Les microbilles superparamagnétiques

Les particules doivent être SPM pour éviter la formation de chaînes de dipôles magnétiques lors de leur manipulation sans champ externe. Dans la partie précédente, nous avons vu que des nanoparticules de fer ont un comportement SPM lorsque leur diamètre est inférieur à 28 nm. Les nanoparticules SPM possèdent une réponse à un champ magnétique qui varie en fonction de la taille. Par exemple, les nanobilles de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de diamètre 7.5 nm et 81 nm présente une courbe d'aimantation différente (M) en fonction du champ appliqué (H) représenté par la figure 3.5.

Les deux graphiques⁷⁷, issues d'un travail de recherche publié par G.Fonnum et al, mettent en évidence une différence de comportement magnétique entre deux tailles de nanoparticules de maghémite. Pour les nanobilles de 7.5 nm, la courbe d'aimantation suit un chemin unique spécifique au comportement SPM sans cycle d'hystérésis et avec une aimantation rémanente nulle. Pour un diamètre égal à 81 nm, on observe l'ouverture d'un cycle d'hystérésis caractéristique d'un matériau ferromagnétique ce qui est en accord avec la théorie du superparamagnétisme.

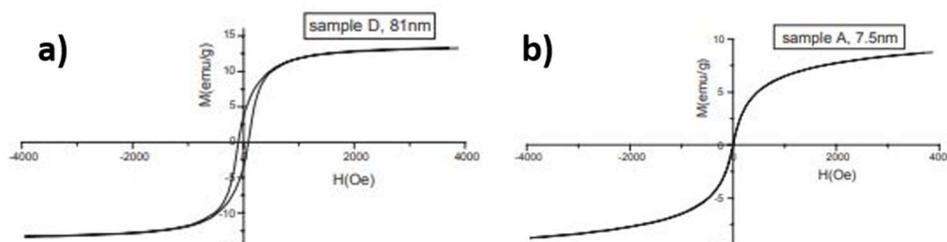


Figure 3.5 : Graphique représentant l'aimantation en fonction du champ appliqué pour des nanobilles d'oxyde de fer de diamètre **a)** 81 nm et **b)** 7.5 nm⁷⁷.

Cependant, la manipulation des particules magnétiques de si petite taille n'est pas possible en utilisant uniquement un aimant permanent. C'est pour cette raison qu'il a été décidé de nous

orienter vers des microbilles SPM Dynabeads de la société Invitrogen dédiées aux applications biomédicales qui sont manipulables au moyen d'un aimant permanent. Ces microbilles sont composées de nanoparticules d'oxyde de fer : magnétite (Fe_3O_4) et maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) emprisonnées dans une matrice de polystyrène qui empêche toute agglomération. D'une part, le volume magnétique contenu dans le polystyrène est suffisamment important pour permettre une manipulation à l'aide d'un aimant permanent. D'autre part les nanobilles encapsulées sont suffisamment petites pour observer un comportement SPM. Le fabricant propose 3 diamètres de microbilles : 4.5 μm (M-450), 2.8 μm (M-280) et 1 μm (MyOne™). La figure 3.6 présente une image MEB d'une microbille M-280⁷⁷. L'image révèle la présence de nanoparticules d'oxyde de fer (blanc) emprisonnées dans le polystyrène (gris). À partir de cette image, le diamètre moyen d'une nanoparticule a été évalué à 7 nm. Cette étude a également été réalisée sur les microbilles M-450 et MyOne dont les résultats sont affichés dans le tableau 3.1.

Le tableau indique une taille de nanoparticules comprise entre 7 nm et 8 nm pour les 3 tailles différentes. Cette taille est en conformité avec la théorie qui évalue, pour l'oxyde de fer, un diamètre inférieur à 28 nm pour garantir le phénomène de superparamagnétisme.

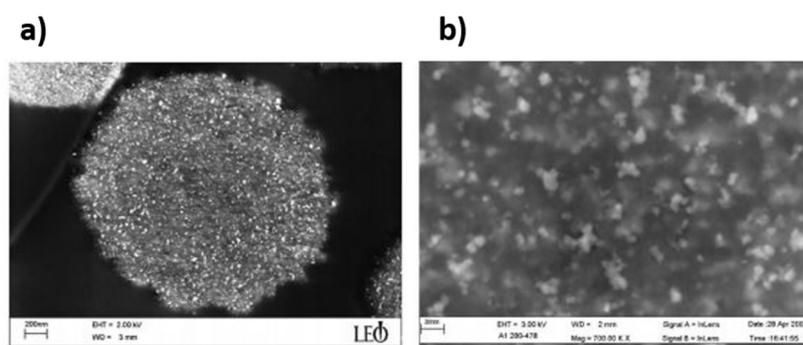


Figure 3.6 : Image MEB d'une microbille SPM à deux échelles de tailles différentes. **a)** de nombreuses nanoparticules d'oxydes de fer sont révélées en blanc **b)** les nanoparticules possèdent des tailles et des formes variées⁷⁷.

Microbille	Diamètre des microbilles (μm)	Diamètres moyens des nanoparticules (nm)
M-450	4.4	7.8-8.1
M-280	2.83	7.5-8.5
MyOne™	1.05	7.4-7.7

Tableau 3.1 : Tableau résumant les mesures des tailles des microbilles et nanobilles étudiés.

Le graphe 3.7 représente l'évolution de l'aimantation en fonction du champ magnétique externe appliqué pour des microbilles MyOne™ fourni par le fabricant. Nous constatons que la courbe est caractéristique d'un comportement SPM sans cycle d'hystérésis et présentant une aimantation rémanente nulle à champ nulle.

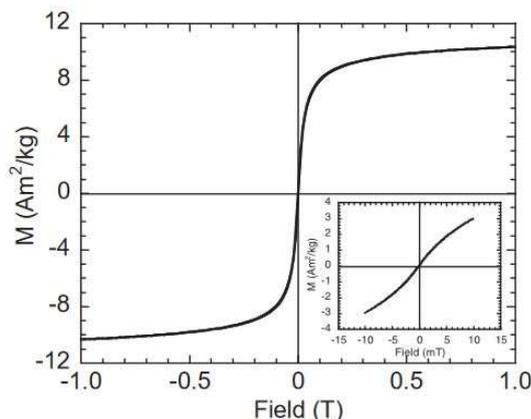


Figure 3.7 : Graphique montrant l'évolution de l'aimantation des microbilles SPM de 1 μm en fonction du champ appliqué⁷⁵.

Tout d'abord, les différents comportements des matériaux magnétiques ont été introduits ainsi que certaines grandeurs physiques. La susceptibilité magnétique est une grandeur qui caractérise la réponse d'un matériau à un champ magnétique externe. Nous nous sommes intéressés aux matériaux ferromagnétiques qui ont une réponse élevée au champ magnétique. La courbe de l'aimantation décrit un cycle d'hystérésis avec une aimantation non-nulle à champ nul. Le superparamagnétisme est une propriété des nanoparticules magnétique où l'aimantation est considérée comme un spin unique (macrospin) et où l'aimantation est nulle à champ nul. L'intégration de ces nanoparticules dans une sphère de polystyrène permet d'obtenir le comportement SPM au sein d'une particule micrométrique.

3.2 Principe théorique

3.2.1 Magnétophorèse et force magnétique

La manipulation des microbilles SPM est effectuée en appliquant un champ magnétique, on parle alors de magnétophorèse. Cependant, un champ magnétique uniforme n'est pas suffisant pour induire un déplacement de particules magnétiques sphériques, il faut au contraire générer un gradient de champ. La force de translation, responsable de la magnétophorèse, est générée par la présence d'un gradient de champ magnétique. La valeur de la force exercée sur la microbille est calculée par l'équation 3.3⁷⁶ qui démontre la nécessité d'un gradient de champ. Dans le cas d'un complexe de microbilles PS-SPM, la force magnétique exercée sur la microbille SPM déplacera le complexe grâce aux liaisons protéines entre les deux microbilles.

$$\vec{F}_m = (\vec{\mu} \cdot \nabla) \vec{B} = \frac{V \chi_m}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{B} \quad (3.3)$$

Nous cherchons à définir la force magnétique en fonction de sa vitesse magnétophorétique \vec{v}_p afin de simplifier la relation 3.3. Une particule magnétique sphérique en suspension dans un liquide subit un gradient de champ magnétique $\nabla\vec{B}$ provenant d'un aimant permanent. Quatre forces s'appliquent principalement sur la particule^{76,78,79} : la force de gravité \vec{F}_g , la poussée d'Archimède \vec{F}_a , la force de freinage visqueux \vec{F}_d et la force magnétique F_m dont nous cherchons à évaluer la valeur, ces 4 forces sont représentées sur la figure 3.8

Les trois premières forces sont définies par les équations 3.4, 3.5 et 3.6. R est le rayon de la particule sphérique, ρ_p la densité du matériau de la particule, ρ_f la masse volumique du fluide, g la constante de pesanteur, η la viscosité dynamique et \vec{v}_p la vitesse de la particule.

$$\vec{F}_g = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_p \vec{g} \quad (3.4)$$

$$\vec{F}_a = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_f \vec{g} \quad (3.5)$$

$$\vec{F}_d = 6\pi\eta R \vec{v}_p \quad (3.6)$$

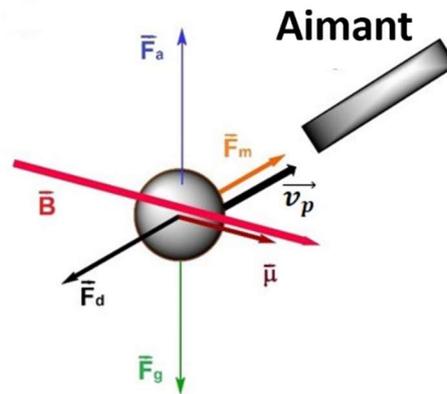


Figure 3.8 : Bilan des forces appliquées sur une microbille SPM soumis à un gradient de champ magnétique $\nabla\vec{B}$.

Lorsque le système atteint l'état d'équilibre, la somme des 4 forces est nulle, ce qui se traduit par l'équation 3.7. Ainsi, la force magnétique F_m peut être calculée en connaissant la vitesse de la particule u_p qui correspond à la vitesse magnétophorétique, tous les autres paramètres sont connus.

$$F_m \vec{e}_z = (F_a - F_g + F_d) \vec{e}_z = \left(\frac{4}{3}\pi R^3 \Delta\rho g + 6\pi R \eta v_p \right) \vec{e}_z \quad (3.7)$$

3.2.2 Séparation magnétique

Le tri magnétique cellulaire a fait l'objet de nombreuses études^{54,55,69,70,80,81}. Il consiste à effectuer un marquage magnétique des cellules d'intérêt via des nano ou microparticules magnétiques. Les particules magnétiques sont fonctionnalisées à l'aide d'anticorps spécifiques qui ciblent des protéines de surface exprimées uniquement chez les cellules d'intérêt. De cette manière, des complexes cellules - microbilles⁸¹ se forment (figure 3.9), le tri cellulaire est

effectué par magnétophorèse en appliquant un gradient de champ magnétique. La figure 3.9 illustre par un schéma et une image microscope des complexes cellule - microbilles, les cellules mesurent environ $10\ \mu\text{m}$ et sont marquées par des particules magnétiques de $1\ \mu\text{m}$. Étant donné que les microbilles utilisées dans ce projet de recherche ont la même taille que les cellules, nous avons choisi d'utiliser cette méthode pour le tri de microbilles.

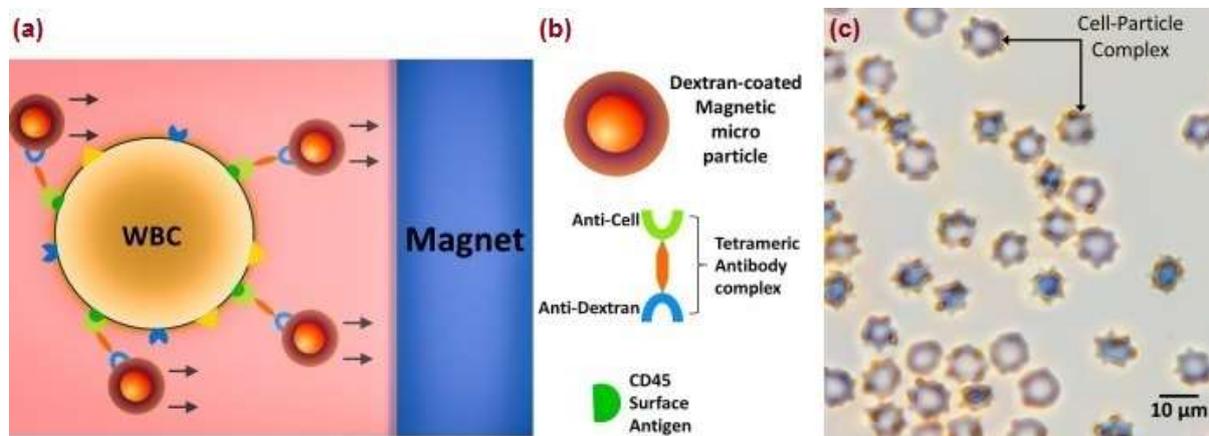


Figure 3.9 : Tri magnétique de cellules humaines WBC (Whole Blood Cell) par magnétophorèse **a)** déplacement magnétophorétique des complexes cellules – particules magnétiques vers un aimant, **b)** légende, **c)** observation microscope des complexes cellules – particules magnétiques⁸¹.

À présent, nous allons décrire comment cet effet physique est exploité pour effectuer un tri magnétique de microbilles afin de séparer les microbilles positives des microbilles négatives après la réaction avec le sérum de patient. Le sérum est le liquide sanguin débarrassé de ses cellules et de ses protéines de coagulation par les procédés de coagulation et de centrifugation comme indiqué par la figure 3.10.

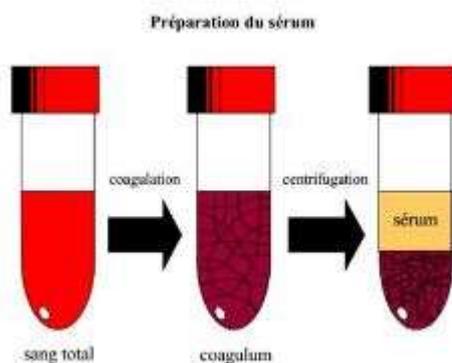


Figure 3.10 : Procédé de coagulation et centrifugation pour obtenir du sérum de patient à partir d'un échantillon sanguin.

Tout d'abord, les microbilles PS – allergènes vont capturer les anticorps IgE spécifiques contenus dans le sérum de patient via une interaction allergène – anticorps primaire.

Les anticorps primaires IgE contenus dans le sérum sont spécifiques, cela signifie qu'ils reconnaissent exclusivement un allergène. Ils se fixent alors sur la microbille PS via une liaison

antigène – anticorps pour former une microbille dite « positive ». Les microbilles n'ayant pas fixé d'anticorps sont dites « négatives ». Les microbilles SPM se fixent aux microbilles positives par l'intermédiaire d'une liaison anticorps primaires – anticorps secondaires. Cette liaison ne se produit pas avec les microbilles négatives qui ne possèdent pas d'anticorps primaires à leur surface. Les forces de liaison entre protéines sont faibles, elles sont constituées d'interactions ioniques, d'interactions de Van Der Waals, de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes. La figure 3.11 présente le schéma de principe du tri magnétique de particule effectué dans des microtubes. La suspension de microbilles contenues dans un microtube « A » est composée de complexe SPM-PS. Un aimant permanent est mis en contact avec le microtube pour générer la magnétophorèse, les complexes vont alors migrer et s'agglomérer sur la paroi (phase solide) en contact avec l'aimant. Le surnageant (phase liquide) est transféré du microtube « A » vers un microtube « B » à l'aide d'une micropipette. Les microbilles sont remises en suspension dans le microtube « A » et l'aimant est enlevé. Le procédé de tri magnétique permet la séparation des deux types de microbilles (positives et négatives), il ne reste plus qu'à procéder au comptage pour évaluer la concentration d'anticorps présent dans le sérum et réaliser un diagnostic.

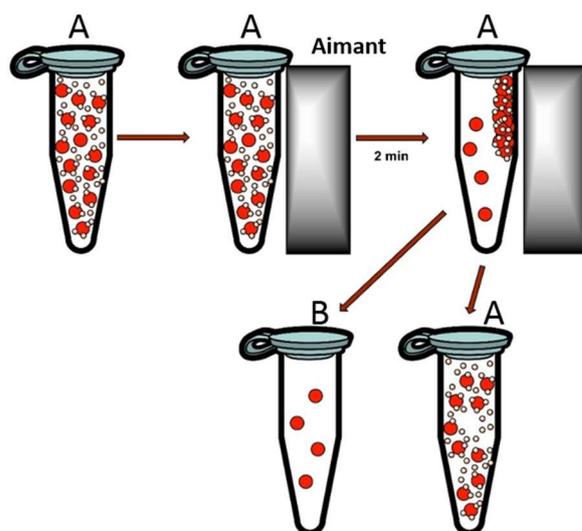


Figure 3.11 : schéma de principe du tri magnétique de particules.

Nous avons détaillé le principe de magnétophorèse. Une particule magnétique soumise à un gradient de champ magnétique subit une force magnétique qui attire la particule vers les zones de plus fort gradient. La séparation magnétique de microbilles repose sur le principe d'agglomération de microparticules SPM avec des microbilles PS recouvertes d'IgE via une liaison anticorps – anticorps. Comme les particules sont larges ($1\ \mu\text{m}$), un aimant permanent génère un gradient de champ magnétique suffisant pour induire un déplacement magnétophorétique.

3.3 Mise en place du dispositif expérimental

3.3.1 Les séparateurs magnétique

De manière générale, les grosses particules magnétiques (> 200 nm) sont plus utilisées que les particules de plus petites tailles qui requièrent des techniques de séparation plus complexes. On oppose la séparation magnétique à gradient élevé^{82,83,84} (HGMS) à la séparation magnétique à faible gradient⁸⁴ (LGMS). Les microparticules sont manipulables avec l'utilisation d'un aimant permanent macroscopique (LGMS). Cependant, comme les nanoparticules sont beaucoup moins volumineuses et subissent une diffusion plus importante, il est nécessaire d'utiliser la méthode de séparation magnétique à gradient élevé (HGMS).

3.3.1.1 Séparation magnétique à gradient élevé HGMS

Un système HGMS est généralement constitué d'une colonne remplie d'une couche de fils magnétiques (diamètre $50 \mu\text{m}$) placée à l'intérieur d'un électroaimant, représenté par la figure 3.12a. Lorsque le champ magnétique est appliqué à travers la colonne, les fils modifient le champ magnétique dans la colonne en produisant des forts gradients de champs autour des fils qui attirent les particules magnétiques à leur surface pour être piégées. Un autre dispositif HGMS combine les techniques de la microélectronique et de la microfluidique afin d'intégrer des micro-aimants dans des dispositifs de petites tailles. En particulier, ceux contenant des microstructures composées de matériaux ferromagnétiques. Ces matériaux sont adaptés pour la manipulation de nanoparticules magnétiques. Les microstructures qui sont intégrées dans un micro-canal permettent de concentrer localement le champ magnétique provenant d'un aimant externe (voir figure 3.12b). Le champ magnétique réorienté augmente la force magnétique F_m et améliore l'efficacité de la séparation.

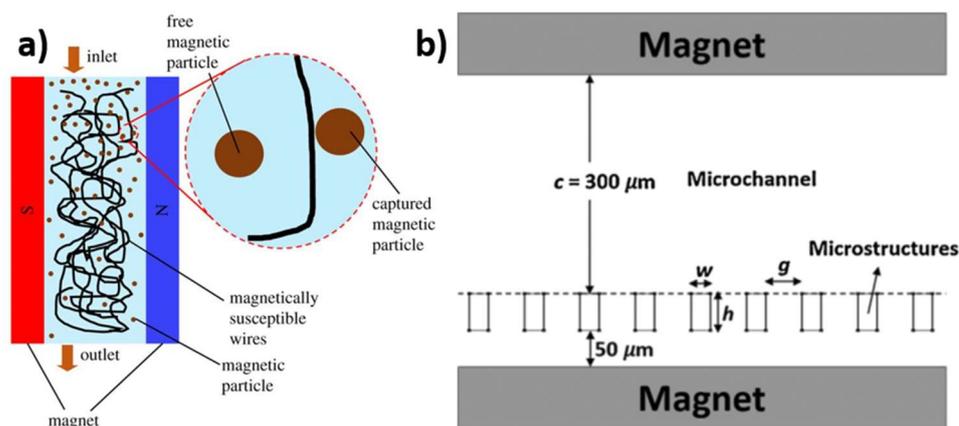


Figure 3.12 : Schéma des dispositifs de gradient de champ magnétique élevé. a) colonne HGMS et b) aimant microstructuré⁸⁴.

3.3.1.2 Séparation magnétique à gradient faible (LGMS)

Lorsque l'on cherche à manipuler des particules micrométriques, il est judicieux d'utiliser un aimant permanent en raison de sa simplicité d'utilisation et de son bas prix. Les aimants de

terres rares produisent les champs magnétiques les plus importants, en particulier ceux constitués en NdFeB. Ils sont vendus à travers une gamme de tailles et de formes très variées.

Le champ magnétique est généré par l'aimant permanent qui induit des forces d'intensité très élevées qui prédominent par rapport aux forces de sédimentation. Cette méthode est avantageuse, car elle permet d'être utilisée sur des volumes de solution plus importants (> 1 ml) contenu dans des microtubes. La force magnétique doit être constante sur la zone de travail pour que les microbilles subissent la même force et se déplacent vers la paroi à vitesse constante. Les systèmes de séparation magnétique actuels sont homogènes et parfaitement adaptés à la manipulation en microtube.

Nous utiliserons un séparateur magnétique à faible gradient (LGMS) car les microbilles à manipuler sont de taille micrométrique Dynabeads MyOne (1 μm) et M-450 (4.5 μm) et ne nécessitent pas de dispositifs à fort gradient contrairement aux nanoparticules SPM.

La photo de la figure 3.13 montre le dispositif de séparation magnétique de type LGMS utilisé pour effectuer le tri magnétique. C'est un aimant permanent plan en NdFeB recouvert d'une couche d'aluminium (en gris) vendu par la société Invitrogen (DynaMag™-2). Ce système est spécialement dédié au tri magnétique cellulaire via des microbilles SPM. Il est livré avec un porte-échantillon amovible afin de maintenir les microtubes de volume 1.5 ml ou 2 ml. Le porte-échantillon peut être placé ou retiré de l'aimant facilement, il comporte 16 emplacements pour microtubes. Ainsi, ce système permet d'effectuer jusqu'à 16 tris magnétiques simultanément.

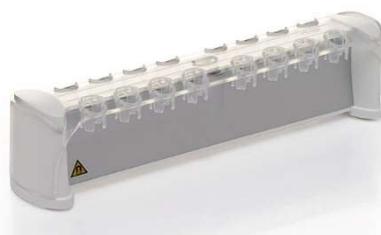


Figure 3.13 : Dispositif de séparation magnétique à faible gradient dédié pour une utilisation de microtubes (1.5ml – 2ml).

3.3.2 Mesure de la vitesse magnétophorétique et de la force magnétique des microbilles SPM

Les microbilles SPM MyOne (1 μm) et M-450 (4.5 μm) ont été caractérisées afin d'évaluer la vitesse magnétophorétique ainsi que les forces magnétiques associés par l'utilisation d'un aimant permanent cylindrique en NdFeB. Cet aimant est différent du dispositif de séparation magnétique qui sera utilisé pour toutes les manipulations de tri magnétique présentés dans ultérieurement. Pour cela, nous avons placé une suspension de microbilles dans un microtube Eppendorf de 2 ml contenant un faible volume de 200 μl de suspension de microbilles SPM. Un aimant permanent cylindrique est placé à une certaine distance de la base de l'eppendorf, voir figure 3.14. L'aimant est mis en contact avec l'eppendorf à l'instant t_0 , la durée de magnétophorèse nécessaire à l'agglomération de toutes les microbilles magnétiques au fond du tube est mesurée. L'expérience est réalisée 3 fois pour le calcul de la moyenne et de l'écart type.

À partir du temps de piégeage mesuré, une vitesse moyenne magnétophorétique est calculée pour les deux tailles de microbilles en fonction de l'espacement entre le microtube et l'aimant. Puis, la force magnétique est calculé à partir de la vitesse magnétophorétique en utilisant la relation 3.7.

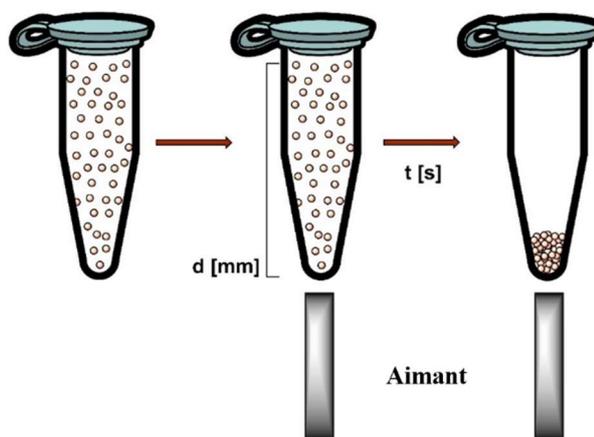


Figure 3.14 : Mesure de la vitesse magnétophorétique.

Le graphique 3.15a montre l'évolution de la vitesse magnétophorétique de deux types de microbilles SPM (1 μm et 4.5 μm) en fonction de la distance à l'aimant. Lorsque l'aimant est proche de la paroi de l'ependorf (6 mm) la vitesse moyenne est de 2.5 et 5.2 mm/s. Cette vitesse diminue fortement (~ 1 mm/s) en éloignant l'aimant (9 mm - 22 mm). Les forces magnétiques ont été calculées et reportées sur le graphique 3.15b. Les valeurs de la force magnétique calculées sont à comparer avec la force de rupture de la liaison anticorps – antigène qui est approximativement de 40 pN. On remarque que pour des distances à l'aimant inférieures à 12 mm, les microbilles M-450 appliquent une force magnétique supérieure à cette force de rupture. Si la liaison microbilles PS – SPM n'est assurée que par une interaction anticorps – antigène, il est probable que le complexe de microbilles se casse. En revanche, l'utilisation de microbilles MyOne (1 μm) produit une force magnétique toujours inférieure à cette valeur limite. Par la suite, une étude comparative sera réalisée sur l'efficacité du tri magnétique pour ces deux tailles de microbilles dans le but de confirmer ce phénomène. Toutefois, nous avons estimé que la stabilité des complexes de microbilles est garantie par plusieurs liaisons anticorps – anticorps et le dispositif de séparation magnétique utilisé pour cette étude est différent de celui utilisé pour les futures manipulations de tri magnétique appliqués aux sérums. Ce résultat démontre uniquement que la force magnétique subit par les microbilles SPM est plus faible pour la plus petite taille de microbilles et qu'il n'est pas possible théoriquement de casser cette liaison lors du processus de magnétophorèse. Il a été choisi d'utiliser le dispositif de séparation magnétique décrit dans la partie précédente, car il est spécialement conçu pour cette application et permet d'éviter l'application d'une force magnétique trop brutale pour une efficacité de tri maximale.

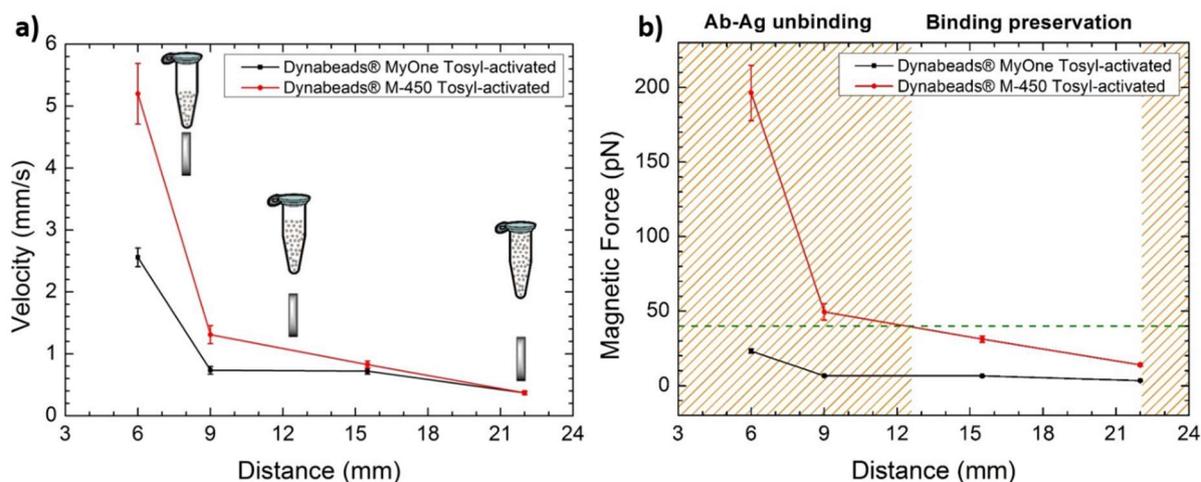


Figure 3.15 : a) Mesure de l'évolution de la vitesse magnétophorétique v_p en fonction de la distance à l'aimant, b) Force magnétique en fonction de la distance à l'aimant F_m .

3.3.3 Mise en évidence du phénomène d'agglomération des microbilles SPM

Une étude⁷⁷ a été menée, par G.Fonnum et al, pour étudier le temps de piégeage des microbilles SPM de différentes tailles au moyen d'un dispositif LGMS. Dans un microtube, les microbilles SPM sont mises en suspension, un gradient de champ magnétique est appliqué au moyen d'un aimant permanent à l'instant t_0 . Le pourcentage de microbilles en suspension en fonction du temps est mesuré, cela représente le pourcentage de microbilles non récupérées par l'aimant. Le résultat de cette étude est présenté sur le graphique 3.17. Les microbilles de plus grandes tailles M-450 (4.5 μm) sont plus rapides à être totalement piégées que pour les microbilles de plus petites tailles M-280 (2.8 μm) et MyOne (1 μm). MyOne et M-280 présentent le même temps de récupération alors qu'elles possèdent des tailles différentes. De plus, le ratio de durée entre MyOne et M-450 est de 4.5. Selon la théorie, la vitesse du déplacement magnétophorétique est proportionnelle à r^2 , le ratio entre les vitesses devrait être égal à 20,25. Ce phénomène est expliqué dans cette étude par une agglomération des microbilles MyOne en raison de leurs petites tailles. Ainsi, ces agrégats de microbilles possèdent une vitesse magnétophorétique plus importante que celle de la microbille individuelle.

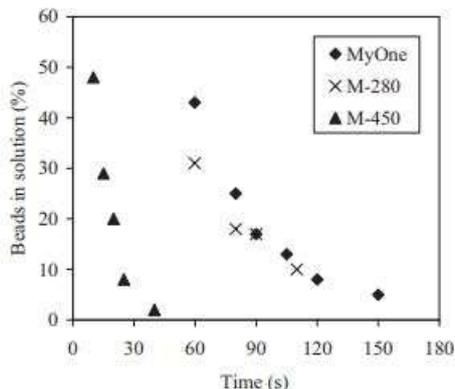


Figure 3.17 : Pourcentage de microbilles en suspension en fonction du temps d'application de l'aimant et de la taille des microbilles⁷⁷.

La figure 3.18, montre une photo prise par microscopie à fluorescence des microbilles SPM MyOne. Elle montre une inhomogénéité de tailles des microbilles SPM. La dispersion de taille est importante, les agrégats formés mesurent 1 μm et 10 μm .

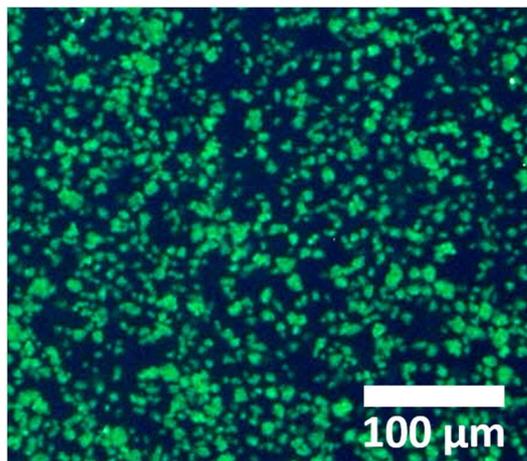


Figure 3.18 : Agrégation des microbilles SPM MyOne (1 μm).

3.3.4 Protocole détaillé du tri magnétique

Nous avons développé le dispositif expérimental utilisé pour la réalisation de séparations magnétiques.

Dans ce chapitre, un sérum de lapin sera utilisé à la place du sérum de patient. Il contient des anticorps primaires d'isotype IgG : anti-*Ara h 1*, anti-*Ara h 2* et anti-*Ara h 3* qui reconnaissent spécifiquement les allergènes majeurs de l'arachide : *Ara h 1*, *Ara h 2* et *Ara h 3*. Le tri magnétique sera effectué par des microbilles MyOne™ fonctionnalisées avec des anticorps secondaires anti-IgG. Ce sérum présente l'avantage de posséder une concentration plus importante en anticorps primaires ce qui nous permet de tester les performances de notre dispositif sans la contrainte d'une faible concentration en anticorps primaires IgE. Les expériences de tri magnétique avec le sérum de patient seront présentées dans le chapitre 5.

3.3.4.1 Séparation magnétique

Premièrement, les microbilles PS - arachide sont mises en suspension en solution tampon PBST 2 % dans un microtube 2 ml. Un volume de 50 μ l de sérum de lapin dilué (dilution optimale : 10^4) est ajouté. Puis, l'ensemble est incubé pendant deux heures à température ambiante.

Les microbilles sont lavées trois fois par centrifugation et changement de milieu afin d'enlever les anticorps primaires libres et les protéines qui pourraient faire écran et diminuer l'efficacité du tri magnétique. Les microbilles magnétiques sont ajoutées aux microbilles PS dans une solution tampon PBST 0.1 %. Le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante.

Les microtubes sont disposés sur l'aimant DynaMag™-2 pendant 2 minutes. Le surnageant est retiré puis disposé dans un autre microtube Eppendorf. Les microbilles du premier tube sont remises en suspension dans une solution tampon PBST 0.1 %.

Ainsi, on obtient deux microtubes, le premier contient les microbilles MyOne™ et PS piégées par la séparation biomagnétique (microbilles positives). Le deuxième microtube contient exclusivement des microbilles PS n'ayant pas réagi lors du tri magnétique (microbilles négatives), le volume est fixé à 1 ml de telle sorte qu'il soit égal au volume du premier microtube.

3.3.4.2 Mesure de la concentration des microbilles positives

Ensuite, la concentration de microbilles positives est mesurée. Cette concentration mesurée est à comparer avec la concentration initiale connue et incubées avec le sérum avant l'étape du tri magnétique. La proportion de microbilles piégées correspond à l'efficacité du tri magnétique. Comme nous l'avons expliqué précédemment, plus ce pourcentage est élevé plus la réaction de microbilles avec le sérum a été importante ce qui traduit une concentration élevée d'anticorps primaires contenus dans le sérum.

Trois techniques sont utilisées pour estimer la concentration de microbilles PS positives.

La première technique consiste à analyser un petit volume au microscope optique. Trois gouttes d'un volume égal à 1 μ l sont déposées sur une lame de verre. L'observation se fait après sédimentation des microbilles sur la lame de verre, les images microscopes permettent de compter le nombre de microbilles par gouttes et de déduire une concentration moyenne.

La deuxième technique consiste à utiliser la technique d'assemblage gravitationnel de microbilles que nous développerons dans le chapitre 4.

La troisième technique exploite les propriétés d'absorbance des microbilles PS pigmentées. L'absorbance de la suspension de microbilles est mesurée grâce à un spectrophotomètre capable de mesurer l'absorbance en solution. Un rayon de lumière blanche, provenant d'une source lumineuse et amené grâce à une fibre optique qui traverse la suspension de microbilles contenue dans une cuvette d'une contenance 2 ml. Pour chaque mesure, le dispositif mesure l'absorption à une certaine longueur d'onde qui varie en fonction de la pigmentation des microbilles. Une courbe de calibration, réalisée au préalable, permet de relier l'absorbance à la concentration de microbilles PS colorées. L'absorbance est mesurée avant et après le tri magnétique et permet de calculer le pourcentage de microbilles PS piégées.

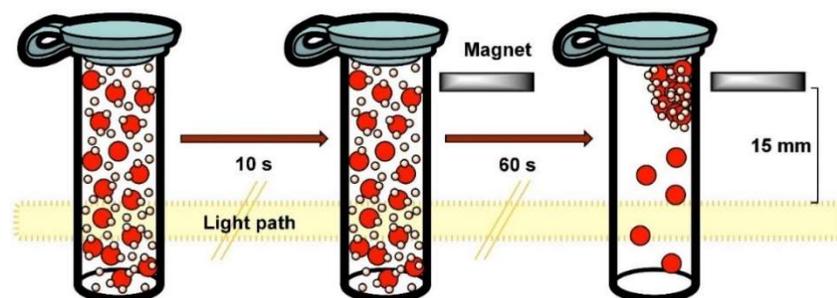


Figure 3.19 : Mesure de l'absorbance de la suspension de microbilles avant et après le tri magnétique pour évaluer la proportion de microbilles positives.

La prochaine partie sera dédiée à la caractérisation et à l'étude des performances du tri magnétique. Dans cette partie, nous utiliserons la première technique pour évaluer le rendement du tri magnétique (pourcentage des microbilles piégées). Les deux dernières techniques seront utilisées dans le chapitre 5 lors des réactions avec le sérum de patient.

Dans cette partie, nous avons mis en place le dispositif expérimental. Les séparateurs magnétiques qui sont regroupés en deux catégories : ceux à gradient de champ élevé nécessitant un appareillage complexe et ceux à champ faible : les aimants permanents. Ces aimants permanents délivrent une intensité de champ suffisamment importante pour la manipulation de particules micrométriques magnétiques. Puis nous avons mesuré la force magnétique subie par les microbilles SPM sous l'action d'un aimant permanent. Une étude comparative sur deux tailles de microbilles SPM a été menée. Nous avons conclu que les microbilles de diamètre 1 μm sont plus adaptées, car la force magnétique développée par les microbilles SPM de 4.5 μm est plus importante que la force de rupture d'une liaison antigène – anticorps. Pour compléter notre étude sur la vitesse magnétophorétique, nous avons mis en évidence le phénomène d'agglomération des microbilles SPM MyOne, en montrant qu'il est plus important sur les microbilles de petites tailles. C'est pour cette raison que le rapport entre les valeurs des forces magnétiques ne correspond pas à celui calculé théoriquement. Le protocole de tri magnétique dure 2 minutes et a été présenté dans ce chapitre. Nous avons également exposé notre technique utilisée pour mesurer et caractériser l'efficacité du tri magnétique en mesurant la concentration de microbilles ayant été piégées magnétiquement.

3.4 Performances du tri magnétique

Nous allons à présent étudier l'influence de certains paramètres sur l'efficacité du tri magnétique. Les séparations biomagnétiques ont été effectuées en utilisant le protocole présenté précédemment. Pour chaque paramètre, le tri magnétique a été réalisé trois fois pour obtenir une moyenne de l'efficacité du tri magnétique. Le nombre de microbilles piégées magnétiquement est évalué et il en est déduit une efficacité de tri magnétique qui est représentée par la valeur du pourcentage de microbilles PS piégées. L'objectif de ces expériences est de savoir quel est la valeur idéale de chacun de ces paramètres pour une efficacité maximale du tri magnétique.

3.4.1 Influence de la taille des microbilles

3.4.1.1 Influence de la taille des microbilles SPM

Nous avons réalisé une étude comparative de tri magnétique avec deux tailles de microbilles SPM (MyOne : 1 μm et M-450 : 4,5 μm). Le protocole expérimental détaillé dans la section 3.3.4.1. a été utilisé. Les microbilles PS utilisées sont de diamètre 10 μm . L'efficacité maximale a été effectuée avec une dilution de sérum égale à 10 000. Le tableau 3.2 montre que l'efficacité est de 90 % avec des microbilles de 1 μm contre 80 % seulement avec les microbilles de 4,5 μm . La limite de détection est d'un ordre de grandeur inférieure avec l'utilisation de microbilles 1 μm . Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les microbilles MyOne présentent une diffusion plus importante d'un facteur 20 (proportionnel à r^2) par rapport aux microbilles M-450. De plus, la force magnétique des microbilles M-450 est plus forte que la force de rupture d'une liaison IgE – anti-IgE. Même si la liaison est garantie par plusieurs liens anticorps – anticorps, ce phénomène pourrait expliquer une baisse de performance du tri magnétique.

Microbilles SPM	M-450 (4.5 μm)	MyOne (1 μm)
Efficacité maximale du tri magnétique	80 %	90 %
Limite de détection	Dilution : 10^5	Dilution : 10^6

Tableau 3.2 : Comparaison des performances du tri magnétique avec deux tailles de microbilles SPM différentes.

3.4.1.2 Influence de la taille des microbilles PS

En pratiquant de la même manière, nous avons réalisé une étude comparative avec deux tailles de microbilles PS. Le tri magnétique a été effectué en utilisant les microbilles SPM 1 μm présentant de meilleurs résultats qu'avec les microbilles SPM M-450. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.3. L'efficacité maximale du tri magnétique est de 90 % pour des microbilles PS 10 μm et de 99 % pour des microbilles PS 6 μm . Comme avec les microbilles SPM, on obtient des meilleurs résultats avec des microbilles PS de plus petites tailles, ce qui s'explique par le fait qu'elles possèdent une meilleure diffusion (trois fois plus importante). Les

microbilles PS de diamètre 6 μm permettent d'obtenir une limite de détection 10 fois inférieur (10^7).

Fournisseurs	MerckMillipore (10 μm)	BioValley (6 μm)
Efficacité maximale du tri magnétique	90 %	99 %
Limite de détection	Dilution du sérum : 10^6	Dilution du sérum : 10^7

Tableau 3.3 : Comparaison des performances du tri magnétique pour deux tailles de microbilles PS.

3.4.2 Influence de la quantité des microbilles

3.4.2.1 Influence de la quantité de microbilles PS

Nous allons à présent nous intéresser à la quantité de microbilles PS introduite avec le sérum de lapin. Pour réaliser cette étude, trois quantités différentes de microbilles (10^4 , 10^5 et 10^6) ont été utilisées pour un volume de 50 μl de sérum dilué 10 000 fois.

Le graphique de la figure 3.20 expose les résultats de cette expérience. Nous remarquons que plus la quantité de microbilles augmente plus l'efficacité du tri diminue. Ainsi, pour 10^4 microbilles, 99 % de microbilles sont piégées. L'efficacité du tri diminue à 90 % pour 10^5 microbilles et à 45 % pour 10^6 microbilles. On remarque une chute de rendement à partir de 10^5 microbilles.

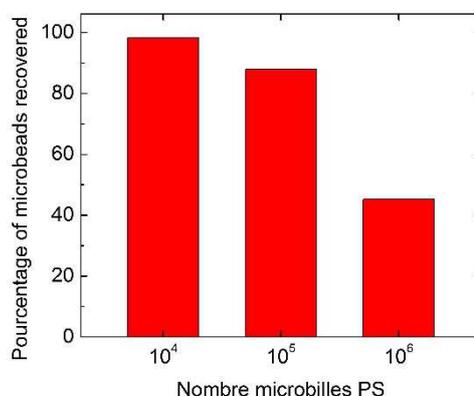


Figure 3.20 : Evolution de l'efficacité du tri magnétique en fonction du nombre microbilles PS.

Ce résultat s'explique par le fait que lorsque la quantité de microbilles est élevée, le nombre d'anticorps IgE par unité de surface est faible. Nous avons effectué un calcul pour déterminer la quantité de microbilles nécessaires pour saturer entièrement leur surface d'anticorps IgE avec un volume de 50 μl de sérum de patient à la concentration de 100 UI/ml (240 ng/ml).

Tout d'abord, nous avons calculé la surface développée d'une microbille de polystyrène (A_{PS}) d'un diamètre (D) égal à 10 μm .

$$A_{PS} = \pi D^2 = 3.14 * 10^8 \text{ nm}^2 \quad (3.8)$$

Puis, le nombre d'anticorps IgE par microbille ($N_{IgE/PS}$) a été évalué lorsque sa surface en est saturée. Pour effectuer le calcul, il a été estimé qu'un anticorps IgE mesure en moyenne 10 nm et qu'il occupe une aire de 100 nm² (A_{IgE}) sur la microbille.

$$N_{IgE/PS} = \frac{A_{PS}}{A_{IgE}} = 3.14 * 10^6 \quad (3.9)$$

Ensuite, le nombre d'anticorps IgE (N_{IgE}) contenu dans un volume de 50 µl de sérum de patient à la concentration de 100 UI/ml est calculé. La masse molaire d'anticorps IgE (M_{IgE}) est de 200 kDa, N_A est la constante d'Avogadro : $6.022 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, m est la masse d'anticorps IgE contenus dans le volume de 50 µl de sérum et égale à 12 ng.

$$N_{IgE} = \frac{mN_A}{M_{IgE}} = 3.6 * 10^{10} \quad (3.10)$$

Puis, le ratio entre les deux grandeurs N_{IgE} et $N_{IgE/PS}$ donne le nombre de microbilles nécessaire pour atteindre la saturation : $1,12.10^4$ microbilles.

$$N_{PS} = \frac{N_{IgE}}{N_{IgE/PS}} = 1.12 * 10^4 \quad (3.11)$$

Ce résultat indique que le nombre de microbilles PS optimal pour l'analyse de 50 µl de sérum de patient est égale à $1.12 * 10^4$.

3.4.2.2 Influence du ratio de la quantité de microbilles PS/SPM

Le ratio PS/SPM ou PS magnétique sur la figure 3.21 est le nombre de microbilles SPM pour une microbille PS. Nous avons réalisé cette étude avec 3 ratios différents : 10, 100 et 1 000.

La figure 3.21 montre les résultats de cette étude. Lorsque le ratio est égal à 1 000, l'efficacité est de 100 %, 97 % pour 100 et 30 % pour 10. Ce ratio correspond au nombre maximal de microbilles SPM qui peuvent se fixer par microbille PS. Ainsi, plus le ratio est grand plus le nombre de microbilles SPM fixé par microbilles PS est important. La probabilité qu'une microbille PS positive soit marquée magnétiquement est plus importante. Ainsi, pour un ratio

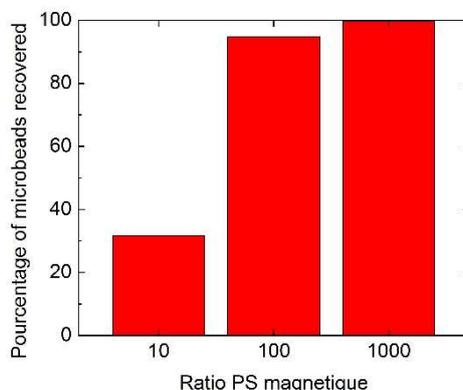


Figure 3.21 : Evolution de l'efficacité du tri magnétique en fonction du ratio quantité de microbilles PS – SPM.

élevé, les microbilles PS sont plus réactives au gradient de champ magnétique avec une vitesse magnétophorétique et une efficacité de tri magnétique plus élevée.

3.4.3 Influence du temps de réaction

Nous avons également conduit une étude pour déterminer le temps de réaction optimal entre le sérum et les microbilles PS de 10 μm . Le procédé de tri magnétique a été réalisé avec 4 temps de réaction différents : 5 min, 20 min, 1 h et 2 h.

A partir du graphique de la figure 3.22, il est constaté que l'efficacité est de 95 % pour 2 h, 94 % pour 1 h, 90 % pour 20 minutes et 80 % pour 5 minutes. On remarque qu'il y a peu de

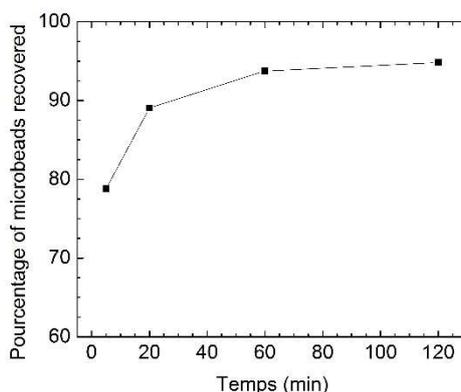


Figure 3.22 : Evolution de l'efficacité du tri magnétique en fonction du temps de réaction des microbilles PS avec le sérum.

variation d'efficacité entre 20 minutes et 2 heures (90 % à 95 %). Cependant, lorsque le temps de réaction est faible 5 minutes, l'efficacité chute à 80 %. Pour un temps de réaction court, tous les anticorps ne se sont pas fixés à la surface de la microbille PS. Ainsi, la couverture des anticorps primaire n'est pas maximale et l'efficacité du tri magnétique diminue. Cependant, ce résultat montre qu'il est possible théoriquement avec cette technologie de réaliser des diagnostics d'allergies plus rapidement (20 minutes) que par des technologies actuellement utilisées dans le laboratoire d'analyses médicales. En effet la technologie ImmunoCap qui repose sur le principe FEIA décrit dans le chapitre 1 a une durée de réaction de 2 h 30.

3.4.4 Evolution du tri magnétique en fonction de la concentration d'anticorps primaires

Il est important de connaître l'évolution de l'efficacité de tri magnétique en fonction de la concentration d'anticorps spécifique présent dans le sérum. Nous avons réalisé des tris magnétiques pour différentes dilutions du sérum de lapin compris entre 1 et 10^8 . Afin de tracer la courbe de l'efficacité en fonction de la concentration, nous avons utilisé 12 dilutions différentes de sérum de lapin. Le protocole utilisé est celui explicité dans la partie précédente avec l'utilisation de microbilles PS 10 μm et des microbilles SPM 1 μm .

Les résultats sont présentés sur le graphique de la figure 3.23 ci-dessous. Pour les fortes dilutions (10^8 à 10^5) l'efficacité du tri magnétique est inférieure à 5 %. Cette valeur de 5 % est égale à

l'efficacité du tri magnétique pour des microbilles témoins fonctionnalisées avec la protéine BSA. La protéine BSA (Bovine Serum Albumin) est une protéine qui ne réagit pas avec le sérum de lapin. Pour les dilutions comprises entre 10^5 et 10^2 (cadre bleu), l'efficacité du tri magnétique augmente significativement (de 5 % à 70 %), on remarque que l'évolution de l'efficacité est corrélée avec la diminution de la dilution. Pour les dilutions faibles comprises entre 10^2 et 1, l'efficacité augmente modérément de 70 % à 90 %. Nous avons mis en évidence 3 zones : 1) à très forte dilution, l'efficacité est constante et égale à 5 %, 2) pour des dilutions intermédiaires, l'efficacité augmente fortement et 3) pour les dilutions très faibles, la valeur de l'efficacité augmente plus modérément. Dans la deuxième zone identifiée par le cadre bleu, la courbe s'apparente pratiquement à une droite. Cela signifie que l'on peut corréler l'efficacité du tri magnétique avec la concentration des anticorps primaires selon un comportement linéaire.

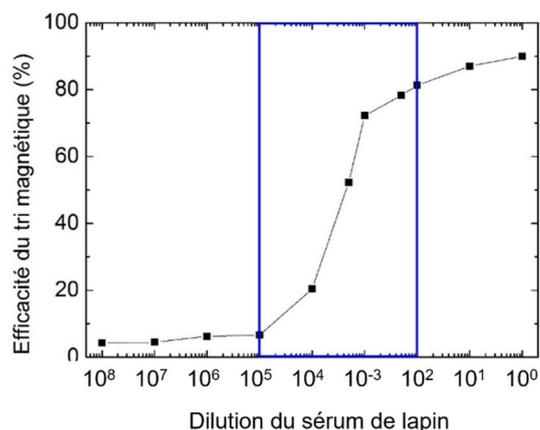


Figure 3.23 : Courbe de l'efficacité du tri magnétique en fonction de la concentration des anticorps primaires contenus dans le sérum.

L'efficacité du tri magnétique dépend de nombreux paramètres. Le développement de cette technologie a consisté à trouver les valeurs de certains paramètres critiques pour augmenter l'efficacité (90 %) et diminuer le temps de procédé (1 h). Cette étude nous a permis de trouver la valeur optimale des paramètres étudiés pour augmenter au maximum l'efficacité du tri magnétique et de diminuer la limite de détection. L'étude de l'influence de la concentration des anticorps primaires du sérum a été réalisée avec les microbilles de diamètre 10 μm . Par conséquent, il est important de souligner que l'utilisation des microbilles de diamètre 6 μm pourrait permettre de diminuer la limite de détection.

Nous avons étudié l'influence de certains paramètres sur l'efficacité du procédé de tri magnétique. Tout d'abord, l'influence de la taille des microbilles PS et SPM a été étudiée. Dans notre étude, nous avons montré que diminuer la taille des microbilles PS (6 μm contre 10 μm) et SPM (1 μm contre 4.5 μm) rend le tri magnétique plus efficace. Ainsi, le procédé permet d'abaisser la limite de détection.

Nous avons montré que la quantité de microbilles PS et SPM par test a également une influence. Une diminution du nombre de microbilles PS d'une part et une augmentation du nombre de microbilles SPM permettrait d'améliorer le rendement et la limite de détection.

Il a été montré que le temps minimal de réaction entre les sérums et les microbilles PS est de 20 min pour une baisse d'efficacité de 5 % par rapport à un temps de procédé de 2 h.

Nous avons démontré que l'efficacité du tri magnétique dépend de la concentration en anticorps primaire contenu dans le sérum. Cela permet de mesurer la concentration d'IgE d'un sérum de patient par évaluation de l'efficacité du tri magnétique.

3.5 Conclusion

La technologie du tri magnétique de microbilles a été développée à partir du tri magnétique de cellules. Un dispositif expérimental (LGMS) a été mis en place avec un protocole permettant une efficacité maximale et un temps de procédé minimal.

Les microbilles SPM possèdent une aimantation en présence d'un gradient de champ magnétique causé par un aimant permanent. Leur aimantation est nulle à champ nul ce qui évite leurs agglomérations en chaînes de dipôles.

Nous avons défini et présenté le principe physique du déplacement magnétophorétique ainsi que la séparation biomagnétique.

Un protocole expérimental a été mis en place à l'aide d'un aimant permanent en néodyme.

Nous avons étudié l'influence de certains paramètres (taille de microbilles, quantités de microbilles, ratio PS-SPM et temps de réaction) en réalisant des manipulations de tri magnétique permettant de caractériser le système expérimental.

Finalement, une courbe de calibration reliant l'efficacité du tri magnétique et la quantité d'anticorps a été tracée. L'expérience a montré que pour une certaine gamme de concentration d'anticorps l'efficacité du tri magnétique varie quasi linéairement. Ce dernier résultat permet d'affirmer qu'il est possible d'évaluer la concentration d'anticorps primaires IgE spécifiques d'un sérum en mesurant l'efficacité du tri magnétique.

Dans ce chapitre, nous avons développé la technologie de tri magnétique aussi appelé séparation biomagnétique pour isoler les microbilles recouvertes d'anticorps primaires IgE afin de les compter. La technologie aboutissant au comptage de microbilles sera développée dans le chapitre suivant. En effet, l'assemblage gravitationnel permet de disposer des microbilles en très grandes quantités en moins de 30 minutes suivant un réseau 2D sur un échantillon microstructuré.

Chapitre 4 : Développement d'une technologie d'assemblage gravitationnelle de microbilles en 4 étapes ultra-rapides pour le comptage de particules

Chapitre 4 : Développement d'une technologie d'assemblage gravitationnelle de microbilles en 4 étapes ultra-rapides pour le comptage de particules.....	83
4.1 Méthode d'assemblage de microbilles sur une surface structurée.....	85
4.1.1 Phénomènes physiques mis en jeu lors de l'évaporation.....	85
4.1.2 Assemblage de particules uniques sans évaporation.....	88
4.1.3 Assemblage par évaporation naturelle.....	89
4.1.4 Assemblage par évaporation contrôlée.....	91
4.2 Observation de l'assemblage thermodynamique de microbilles.....	93
4.2.1 Montage expérimental.....	93
4.2.2 Observations et résultats.....	94
4.3 Développement de la technologie d'assemblage gravitationnel en 4 étapes.....	97
4.3.1 Etape 1 : dissolution des bulles d'air.....	98
4.3.2 Etape 2 : sédimentation.....	99
4.3.3 Etape 3 : piégeage thermique.....	100
4.3.4 Etape 4 : Balayage capillaire.....	100
4.4 Dispositif expérimental.....	102
4.4.1 Description du dispositif expérimental.....	102
4.4.2 Fabrication de la cellule microfluidique.....	103
4.5 Etude des points de fonctionnement.....	106
4.5.1 Etape 1.....	106
4.5.2 Etape 2.....	107
4.5.3 Etape 3.....	108
4.5.4 Etape 4.....	109
4.6 Performances de la technologie d'assemblage gravitationnel.....	110
4.6.1 Etude de l'influence de la concentration de microbilles sur le taux d'assemblage....	111
4.6.2 Réalisation d'assemblages successifs.....	112
4.7 Conclusion.....	115

Dans le chapitre précédent, nous avons développé la technologie de tri magnétique afin d'isoler la population de microbilles ayant réagi avec le sérum de patient. Les microbilles en suspension dans un volume de liquide doivent être disposées en un réseau 2D de particules uniques à la surface d'un échantillon (figure 4.1) pour faciliter le comptage des microbilles.

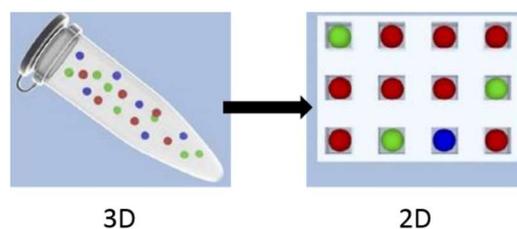


Figure 4.1 : Schéma de l'objectif d'assemblage : disposer des microbilles contenues dans un volume sur une surface.

Nous avons choisi de nous diriger vers des techniques d'auto-assemblage de particules qui ont fait l'objet de nombreuses études. Ces technologies sont étudiées depuis les années 1990 pour réaliser principalement deux grandes catégories d'objets⁸⁵. La première catégorie correspond aux réseaux de particules auto-organisées en 2 ou 3 dimensions (figure 4.2a). La seconde catégorie d'objet, celle que l'on souhaite reproduire, regroupe l'ensemble des structures discrètes positionnées de manière déterministe sur une surface (figure 4.2b). Toutes les méthodes de fabrications associées peuvent être regroupées en deux catégories : les méthodes consistant à contrôler l'évaporation naturelle et celles consistant à forcer l'évaporation par une action mécanique.

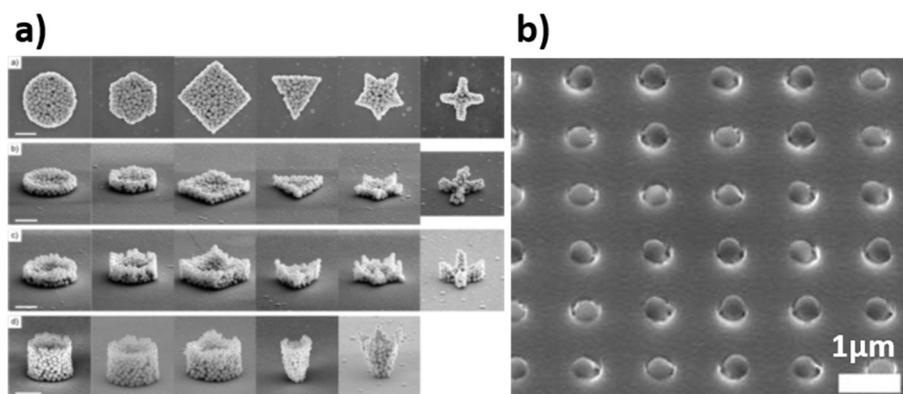


Figure 4.2 : a) Image MEB de structures 2D/3D de particules de formes et de dimensions différentes, b) réseau de particules uniques disposées sur une surface structurée⁸⁵.

Tout d'abord, l'état de l'art des méthodes d'assemblage de particules uniques est exposé.

Puis, nous nous sommes intéressés à la technologie d'assemblage thermodynamique (contrôle de l'évaporation naturelle) qui a fait l'objet de plusieurs études dans notre laboratoire ainsi que l'émergence de la start-up : Smart Force Technologies. La présentation de cette technologie, ses principes physiques, ses performances ainsi que ces limitations feront l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

Dans la troisième partie, nous exposerons la méthode d'assemblage gravitationnel en quatre étapes, que j'ai développée durant ma thèse, spécialement dédiée aux microbilles polystyrènes de 10 μm. Ses principes physiques et son intérêt par rapport à l'assemblage thermodynamique seront abordés. Les différentes étapes du procédé seront décrites et caractérisées.

La quatrième partie sera consacrée au dispositif expérimental et à la mise en place du protocole d'assemblage.

L'étude des points de fonctionnements de chaque étape sera traitée dans la cinquième partie.

Nous exposerons les performances de cet assemblage dans une sixième partie. Les limitations de cette technique seront investiguées par un assemblage ultra rapide sur une grande surface. Puis nous étudierons l'influence de la concentration de microbilles et d'assemblages successifs sur la qualité de l'assemblage.

4.1 Méthode d'assemblage de microbilles sur une surface structurée

Nous allons présenter les différentes techniques d'assemblage de particules nanométriques ou micrométriques sur un substrat structuré à partir d'une suspension de particules. Il est important d'utiliser des substrats dont la dimension des motifs soit du même ordre de grandeur que la taille des particules afin d'obtenir un réseau de particules uniques. La plupart de ces techniques reposent sur l'évaporation naturelle ou contrôlée d'une suspension de particules déposée un substrat structuré. Ces techniques exploitent les flux provoqués par l'évaporation et les forces de capillarités présentes à l'interface triple (échantillon – air – liquide). Nous nous sommes également intéressés aux méthodes ne faisant pas intervenir l'évaporation.

4.1.1 Phénomènes physiques mis en jeu lors de l'évaporation

Avant de faire la liste des différentes techniques d'assemblage de particules uniques les phénomènes physiques présents lors de l'évaporation d'une goutte de suspension colloïdale ont été étudiés. Dans cette partie, nous montrerons comment ces phénomènes peuvent être exploités pour réaliser des structures discrètes de particules sur un échantillon structuré.

4.1.1.1 Modes d'évaporation d'une goutte posée sur un échantillon

De précédents travaux de thèse effectués au LTM par Tatiana Pinedo Riviera⁸⁶ démontrent que lors de l'évaporation d'une goutte sur un échantillon, on distingue trois sortes de régime : le mode d'évaporation à angle de contact constant, le mode d'évaporation à surface de contact constante et le mode mixte⁸⁶. Dans le cas du mode à angle de contact constant, la surface de contact (à l'interface solide/liquide) diminue (figure 4.3a). La ligne de contact recule et le diamètre de la goutte diminue en s'accéléralant vers la fin de l'évaporation. Pour l'évaporation à surface de contact constant, l'angle de contact et la hauteur de la goutte diminuent (figure 4.3b). La ligne de contact est immobile et ancrée sur la surface de l'échantillon. Un troisième mode d'évaporation a été étudié, le mode mixte correspondant à la combinaison des deux précédents modes décrits. L'angle de contact et la surface de contact diminuent de manière simultanée ou discontinue. Bourges Monnier et Shanahan⁸⁷ ont montré que l'évaporation d'une goutte sur une surface non-idéale (présence de rugosité) ne suit pas un seul et unique mode. L'évaporation présente des régimes d'évaporation suivant les 3 modes décrits. Ils ont étudié l'évaporation d'une goutte d'eau sur une résine d'époxy et ont mis en évidence 3 régimes d'évaporation. Le régime 1 correspond au mode à surface de contact constant, le régime 2 au mode à angle de contact constant et le régime 3 au mode mixte.

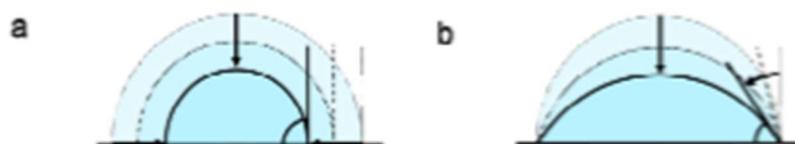


Figure 4.3 : Evaporation d'une goutte suivant le mode **a)** à angle de contact constant, **b)** à surface de contact constante⁸⁷.

4.1.1.2 Flux de liquide générés lors de l'évaporation

Lors de l'évaporation d'une goutte posée sur un échantillon ayant une température supérieure à celle de l'air ambiant, il a été mis en évidence la présence de flux de liquide au sein même de la goutte. Deux catégories de flux apparaissent au sein du liquide⁸⁶. Un flux de convection Marangoni induit par le gradient de température et un flux induit par le gradient du taux d'évaporation à la surface de la goutte.

Flux de convection Marangoni dans une goutte chauffée par l'échantillon

L'instabilité thermo-capillaire de Bernard-Marangoni aussi appelé effet Marangoni⁸⁸⁻⁹⁰ est une instabilité interne qui intervient lorsqu'une fine couche de liquide est chauffée par une surface sur laquelle elle repose. Lorsque la température de la surface est supérieure à celle de l'air ambiant, un gradient de température est généré. Le sommet de la goutte qui est le point le plus distant de l'échantillon correspond à la zone la plus froide alors que le bord de la goutte en contact avec l'échantillon est la zone la plus chaude. Ce gradient de température génère un gradient de tension de surface sur la surface libre de la goutte. Ainsi, la tension superficielle est plus élevée au sommet de la goutte. L'effet Marangoni suit le mécanisme suivant : une partie de liquide à la surface de la goutte est attiré vers les zones de fortes tensions superficielles. Ainsi, le liquide se déplace des zones chaudes vers les zones froides. Dans l'hypothèse des liquides incompressibles, le liquide à l'intérieur de la goutte remonte vers la surface pour compenser la perte de liquide à la surface de la goutte.

Le phénomène de refroidissement par évaporation est considéré négligeable par rapport à l'apport de chaleur de la surface chauffante qui est la principale source de chaleur. La figure 4.4 montre les flux de convection Marangoni générés à l'intérieur de la goutte. À la surface de la goutte, le liquide est attiré vers le sommet de la goutte, par conséquent le liquide à l'intérieur de la goutte se déplace vers le bord de la goutte pour compenser la perte de liquide générant des flux de convections.

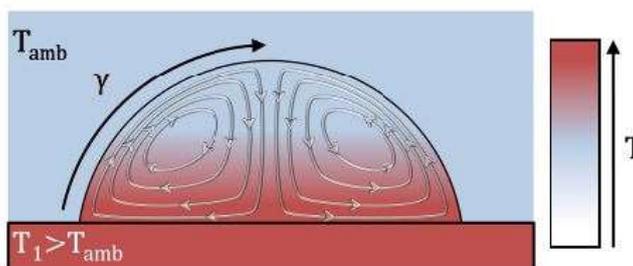


Figure 4.4 : Lignes de courant générées par les flux de convection au sein d'une goutte chauffée par un échantillon⁸⁶.

Flux hydrodynamique induit par évaporation

Les phénomènes thermo-capillaires ne sont pas les seuls phénomènes responsables de la naissance d'un flux au sein d'une goutte. L'évaporation est un autre phénomène qui peut donner naissance à un flux. La distribution du taux d'évaporation à la surface de la goutte est non-uniforme. Dans leur recherche, Hu et Larson ont étudié l'évaporation d'une goutte posée sur un échantillon. Leurs travaux démontrent que le taux d'évaporation d'une goutte posée est plus important aux bords de celle-ci (figure 4.5). De cette manière, la perte de liquide est plus importante à cet endroit. Par conséquent, un flux hydrodynamique s'établit en direction du bord de la goutte pour compenser cette perte.

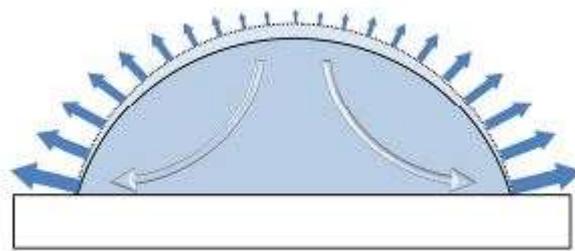


Figure 4.5 : Taux d'évaporation non-uniforme provoquant des flux hydrodynamiques au sein d'une goutte⁸⁶.

4.1.1.3 Evaporation d'une goutte de suspension colloïdale

Nous nous intéressons à ces phénomènes de flux lors de l'évaporation d'une goutte de suspension colloïdale qui permet l'auto-assemblage de colloïdes sur la surface de l'échantillon. On peut ainsi observer la formation de réseaux 2D ou 3D⁹¹ ou de plusieurs anneaux concentriques, de trainées, etc. Sur une surface hydrophile, l'évaporation d'une goutte de suspension colloïdale aqueuse se produit principalement selon le mode d'évaporation à surface de contact constante. La ligne de contact de la goutte est immobile pendant la majeure partie de l'évaporation, les colloïdes sont déplacés par les flux décrits précédemment et un anneau de colloïdes est déposé sur la surface de l'échantillon. Les deux conditions principales nécessaires à la formation d'un anneau de colloïdes sont : une ligne de contact immobile et un flux d'évaporation plus important aux bords de la goutte. De cette manière, un flux global de liquide en direction de la ligne de contact est induit. La force hydrodynamique de ce flux entraîne les colloïdes vers la ligne de contact où ils s'adsorbent à la surface de l'échantillon et s'accumulent, comme le montre la figure 4.6.

Sur une surface hydrophobe, l'évaporation se déroule principalement suivant le mode à angle de contact constant ce qui empêche la formation d'un anneau de colloïdes. La concentration des colloïdes augmente, car la surface de contact de la goutte rétrécit. Lorsqu'une concentration critique est atteinte, on observe la formation d'agrégats de colloïdes.

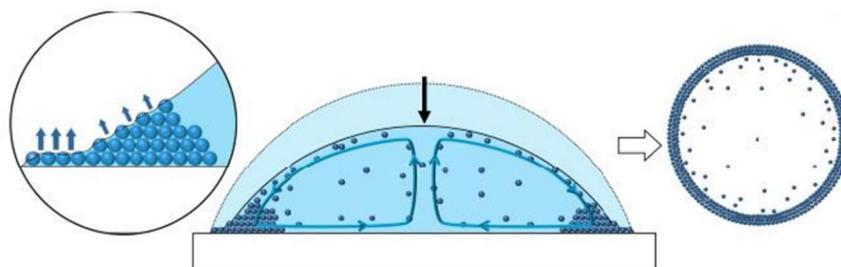


Figure 4.6 : Comportement d'une goutte de suspension colloïdale en évaporation sur un échantillon et formation d'anneaux de colloïdes⁸⁶.

Sur des surfaces hydrophiles, le profil du ménisque induit un confinement vertical des particules proche de la ligne de contact. Dans ce cas, on observe la formation de structures 2D. Cependant, sur des surfaces hydrophobes, la composante de la force de capillarité exercée par le ménisque parallèle à l'échantillon est suffisamment élevée pour empêcher le dépôt de particules sur des surfaces planes. Dans le cas de surfaces structurées (nano et microstructures, électrodes, gradient de mouillabilité), la composante horizontale de la force de capillarité est compensée par une autre force. Dans le cas des motifs topographiques, la composante horizontale est contrebalancée par une structure verticale. La composante verticale de la force de capillarité

permet de piéger un ou plusieurs colloïdes à l'intérieur de microstructures en forme de creux présent à la surface.

4.1.2 Assemblage de particules uniques sans évaporation

Les méthodes permettant l'auto-assemblage de particules uniques sans évaporation sont réalisées soit en appliquant un champ électrique soit en utilisant des particules denses subissant de manière non-négligeable la force gravitationnelle.

- Assemblage électrophorétique

Whitesides. G.M et al⁹² ont décrit une technique d'auto-assemblage de microbilles PS (diamètre de 2 μm) sur une électrode structurée sous l'action d'un champ électrique. Ils ont démontré qu'il est possible de réaliser des assemblages de structures discrètes ordonnées suivant des réseaux 2D sur des surfaces larges de 0.7 cm^2 présentant un taux de défauts (particules en excès ou en défauts) inférieur à 1 %. L'assemblage se fait en phase liquide sur un échantillon de chrome structuré par des électrodes en or (figure 4.7a et 4.7b). Les microbilles sont ensuite injectées dans la cellule fluïdique (figure 4.7c). L'application du champ électrique (figure 4.7d) permet le déplacement et l'organisation des microsphères sur les électrodes de l'échantillon (figure 4.7e). La figure 4.7f montre le réseau de structures discrètes (particules uniques) avec un taux de défaut faible, 2 défauts ont été comptabilisés sur une seule image représentant une petite surface (10 mm^2) de l'échantillon. Cette méthode permet d'ordonner des structures qui ne peuvent pas être réalisées par des méthodes de lithographie classique. L'étude a montré que la valeur du champ électrique est un paramètre critique influant sur la qualité de l'assemblage. La valeur optimale a été déterminée à 20 kV. Une autre étude³⁷ a été conduite par un autre groupe de recherche pour l'assemblage de particules par électrophorèse. Ils ont appliqué un champ électrique pulsé permettant d'assembler rapidement des particules polystyrènes (0.4 μm et 1 μm) avec une densité très élevée.

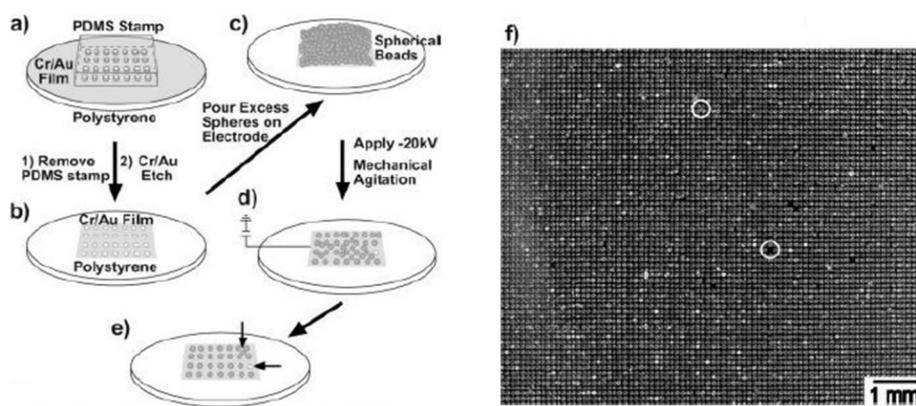


Figure 4.7 : Assemblage de particules par électrophorèse⁹² : formation de l'échantillon à électrodes d'or structurées par **a)** tamponnage, **b)** gravure, **c)** injection des billes sphériques, **d)** agitation mécanique et application d'un champ électrique pulsé à 20 kV, **e)** formation d'un réseau de microbilles de verres comportant des défauts (microbille en défaut ou en excès) à un taux de 1%. **f)** Image microscope de l'échantillon comportant le réseau de microbilles assemblées.

- Assemblage gravitationnel

Yeh.h et al propose une méthode d'assemblage dit fluïdique pour l'intégration de LED GaAs sur un substrat de silicium⁹³. Les LED sont assemblées en phase liquide dans de l'éthanol, les LED en forme trapézoïdale (figure 4.8) ont été conçus de manière à épouser la forme des sites d'assemblages. Cette différenciation de formes oriente correctement les LED à l'intérieur des motifs et permet d'obtenir des connexions électriques optimales avec le substrat. L'étude a montré qu'il est possible d'assembler 3 millions de LED sur la surface d'un wafer de silicium de 2 pouces (diamètre de 50.8 mm).

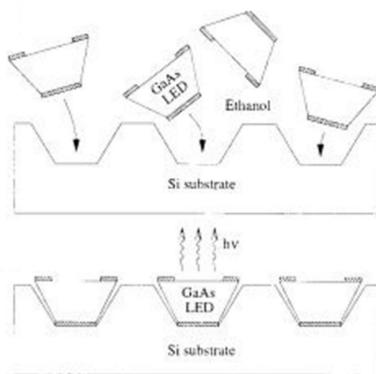


Figure 4.8 : Assemblage hydrodynamique de microLED sur un échantillon de silicium⁹³.

4.1.3 Assemblage par évaporation naturelle

- Evaporation d'une goutte sur un échantillon comportant des motifs topographiques

L'auto-assemblage par évaporation naturelle⁹⁴ d'une goutte de suspension colloïdale sur un échantillon contenant des motifs topographiques est le procédé proposé dans une étude menée par le groupe de Choi.S et al. L'échantillon sur lequel repose la goutte de suspension colloïdale contient des motifs creux de forme et de taille définie (figure 4.9a). Ils se sont intéressés à la géométrie des structures réalisées en contrôlant certains paramètres du procédé. En étudiant l'influence des paramètres fondamentaux (volume, concentration et tension de surface), ils ont montré la possibilité de réaliser des structures discrètes. Le phénomène physique intervenant lors de l'assemblage est le même que celui responsable de la formation d'anneaux lors de l'évaporation d'une goutte posée sur un échantillon. En effet, l'évaporation cause une perte de liquide qui est compensée par un flux hydrodynamique d'entraînement qui entraîne les particules vers la ligne triple (interface eau/air/échantillon). L'angle de contact à l'interface eau/air diminue jusqu'à atteindre une valeur de saturation provoquant le déplacement de la ligne triple qui balaye le substrat. Les forces de capillarité permettent le piégeage des particules à l'intérieur des motifs topographiques. L'assemblage se termine lorsque la totalité du liquide s'est évaporée. La figure 4.9b montre un assemblage de particules (3 μm) uniques de silice sur une petite surface.

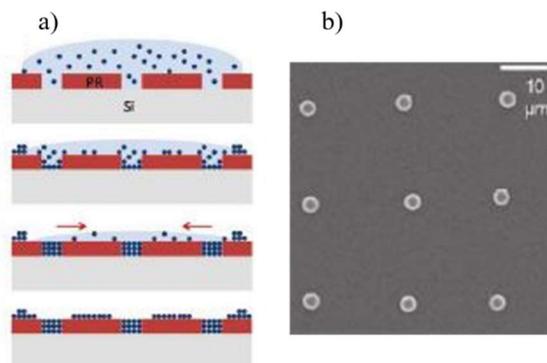


Figure 4.9 : a) Assemblage de particules par évaporation d'une goutte de suspension colloïdale sur un échantillon structuré, b) Assemblage de particules uniques de silice de taille $3\mu\text{m}$ ⁹⁴.

- Evaporation d'une goutte sur un échantillon comportant des domaines de mouillabilité différentes

Une autre technique consiste à assembler des particules par évaporation d'une goutte sur une surface présentant une structuration avec des zones hydrophobes et des zones hydrophiles représentées par le schéma de la figure 4.10a. Fan. F et al⁹⁵ se sont intéressés aux mécanismes d'évaporation et d'auto-assemblage de particules sur cette surface. Lors du retrait de la ligne triple, un démouillage spontanée des domaines hydrophobes vers les domaines hydrophiles s'opère. On observe la formation d'éléments de fluide discrets reproduisant la structuration de la surface. Par conséquent, les particules en suspension se déplacent avec le fluide vers les domaines hydrophiles et se déposent sur la surface lorsque les domaines de fluide discret s'évaporent. L'équipe de recherche a montré qu'en réglant la hauteur de fluide et la dimension des structures du même ordre de grandeur que la dimension des particules, il est possible de réaliser des distributions 0D de particules uniques centrés sur les domaines hydrophiles. Pour obtenir un réseau de particules uniques la taille des zones hydrophiles doit être du même ordre de grandeur que le diamètre des particules. La figure montre le résultat d'un assemblage de particules uniques de polystyrènes (diamètre de $0.8\ \mu\text{m}$). Comme le montre la figure 4.10b, cette technique d'assemblage donne des taux de défauts (site d'assemblage présentant 2 particules) importants supérieurs à 10 % (4 défauts sur 12 sites d'assemblage).



Figure 4.10 : a) Evaporation d'une goutte reposant sur un échantillon comportant des zones hydrophobes et hydrophiles, b) Assemblage de particules uniques⁹⁵.

4.1.4 Assemblage par évaporation contrôlée

- Evaporation par retrait d'une lame horizontal

Pour réaliser l'assemblage de structures discrètes, une technique a été développée⁹⁶ pour l'assemblage de réseaux auto-organisés. Une suspension colloïdale est placée entre un échantillon de PDMS dans lesquels ont été répliqués des motifs lithographiés et une lame de verre. L'échantillon et la lame de verre sont déplacés horizontalement l'un par rapport à l'autre par déplacement motorisé de la lame de verre pour forcer le démoillage de la ligne de contact (figure 4.11a). Le flux hydrodynamique causé par l'évaporation dispose les particules le long de la ligne de contact (figure 4.11b) qui les piège à l'intérieur des motifs grâce aux forces de capillarité. Un réseau de particules uniques a été réalisé en utilisant des microbilles PS de deux tailles différentes 100 nm et 500 nm. La figure 4.11c montre les réseaux denses formés de particules uniques auto-organisées à la surface de l'échantillon.

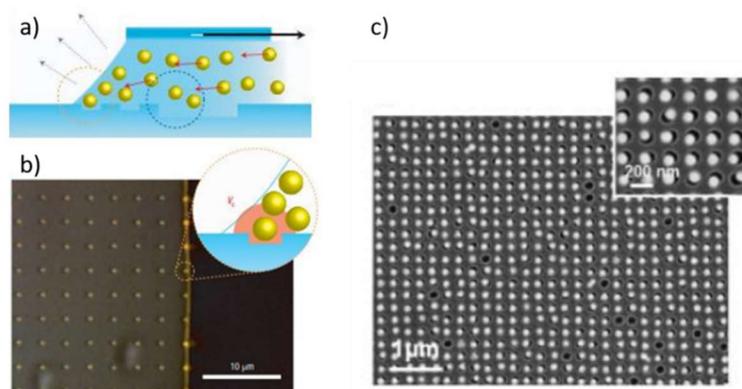


Figure 4.11 : a) Assemblage de particules contenues dans une goutte en évaporation disposée entre un échantillon structuré et une lame de verre mobile, b) Recul de l'interface triple (échantillon – liquide – air) vue de dessus, c) Assemblage de particules uniques⁹⁶.

- Assemblage thermodynamique développé au LTM

L'assemblage thermodynamique⁹⁶⁻⁹⁸ a pour objectif de positionner des nano-micro particules en suspension dans un liquide à l'intérieur de motifs topographiques d'un échantillon structuré. Un certain volume de suspension colloïdale 50 µl est placé sur cet échantillon dans une cellule fluidique confinée. Le contrôle de la température et du taux d'humidité permet de déclencher et de maîtriser l'évaporation du liquide. La figure 4.12 présente de manière schématique le principe physique de cette technologie. Tout d'abord, l'évaporation s'effectue suivant un mode à surface de contact constante, la force hydrodynamique d'entraînement F_d entraîne les particules colloïdales vers la ligne triple (interface air-liquide-échantillon) jusqu'à saturation. Puis, l'évaporation bascule suivant un mode à angle de contact constant ce qui déclenche le déplacement de ligne triple et balaie la surface de l'échantillon. Lorsque cette interface va rentrer en contact avec une particule, le ménisque va se déformer localement pour appliquer une force de capillarité F_{Nc} orientée vers le bas et piéger la particule dans un motif topographique au moment où la ligne balaye ce dernier (voir Figure 4.12). Ainsi, cette méthode utilise les forces de capillarité pour déjouer le mouvement brownien et piéger les particules dans les nano-microstructures du substrat.

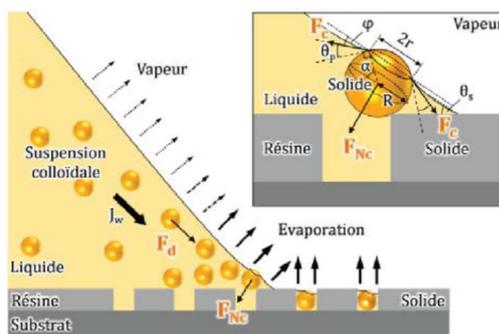


Figure 4.12 : Schéma de principe de fonctionnement de l'assemblage thermodynamique. L'évaporation induit un flux de liquide qui induit une force hydrodynamique d'entraînement F_d qui entraîne les colloïdes vers la ligne triple. F_c est la force de capillarité qui agit sur la particule au niveau de l'interface particule/liquide/air et F_{NC} est la force de capillarité nette qui pousse les particules dans les motifs⁸⁵.

L'assemblage thermodynamique est une technologie qui a été étudiée et développée au sein de notre laboratoire. Cette technologie a donné lieu à la création d'une start-up (Smart Force Technologies) qui commercialise un équipement dédié à cette technologie d'assemblage. Les recherches effectuées sur l'optimisation de la chambre fluidique ont fait l'objet d'un brevet⁹⁹ (figure 4.13a). Cette chambre fluidique est composée d'un canal d'injection de liquide relié à une préchambre, un canal prévu pour l'aspiration d'air et un évent pour le renouvellement de l'air. Le rôle de la préchambre est de remplir la chambre principale sans que la ligne triple ne rentre en contact avec la paroi opposée. Il a été réalisé des assemblages de particules PS 1 μm uniques (figure 4.13b) ou en doublets (figure 4.13c).

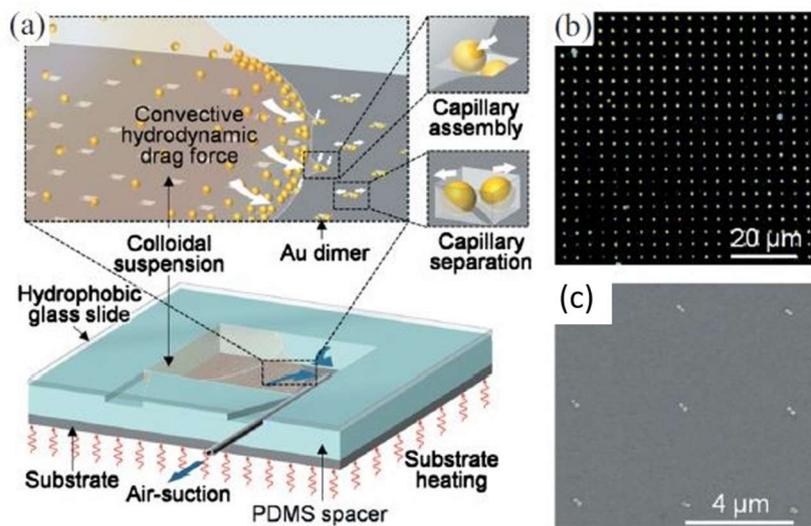


Figure 4.13 : a) Schémas de principe de l'assemblage thermodynamique de particules et de la cellule fluidique, b) photo d'un échantillon d'assemblage de particules, c) particules assemblées en doublets⁸⁸.

Nous avons étudié l'état de l'art des techniques d'assemblage permettant le dépôt de particules uniques sur une surface. Nous les avons séparés en 2 catégories : les méthodes sans évaporation et avec évaporation.

Evaporation d'une goutte

L'étude du comportement d'une goutte lors de son évaporation sur une surface a été abordée. Nous avons montré que les flux de convection ont un rôle fondamental.

En particulier, lorsqu'il s'agit d'une goutte de suspension colloïdale. Les flux de convection déplacent les colloïdes vers la ligne triple. Il a été montré que les forces de capillarité permettent de déposer et de piéger les microbilles à l'intérieur de microstructures.

Assemblage sans évaporation

L'assemblage par électrophorèse et par gravitation permet l'auto-assemblage de particules sans avoir recours à l'évaporation. L'électrophorèse permet la migration de particules rapidement sur des électrodes structurées. Il a été montré que l'assemblage gravitationnel est possible sur des microLED. La gravitation est suffisamment importante pour que la sédimentation soit rapide.

Assemblage par évaporation naturelle

Une goutte de suspension colloïdale est déposée sur une surface contenant des motifs topographiques ou des domaines de mouillabilité variables (succession de domaines hydrophiles et hydrophobes). Cela permet de positionner précisément les particules sur une surface que ce soit au centre des microstructures ou au centre de domaine hydrophile.

Assemblage par évaporation contrôlé

L'assemblage repose sur l'exploitation de la force hydrodynamique d'entraînement et des forces de capillarité à la ligne triple. La vitesse de retrait de la ligne triple est contrôlée pour maîtriser la qualité de l'assemblage.

4.2 Observation de l'assemblage thermodynamique de microbilles

4.2.1 Montage expérimental

Nous avons utilisé le montage expérimental (figure 4.14) de l'assemblage thermodynamique mis à disposition au sein de notre laboratoire. La suspension de microbilles est injectée dans une cellule fluïdique confinée. Elle est composée d'un échantillon structuré par lithographie, de deux espaceurs en PDMS et d'une lame de verre hydrophobe. L'échantillon, lui aussi en PDMS, contient les motifs topographiques dans lesquels seront assemblées les particules. Cet échantillon sera également un support sur lequel reposent les espaceurs. Ils permettront de contenir un volume de suspension de particules pour effectuer l'assemblage. La lame de verre recouvre le tout pour que la cellule soit confinée et que l'on se place en conditions d'atmosphère contrôlée (température et taux d'humidité). La cellule est placée sur un module à effet Peltier qui, combiné avec un système de refroidissement liquide, permet de réguler la température à l'intérieur de la cellule fluïdique. Une pompe péristaltique est utilisée pour aspirer l'air saturé en vapeur d'eau à l'intérieur de la cellule et réguler le taux d'humidité. Le tout est placé dans un support aluminium sur la cellule Peltier, et maintenu en place par une lame métallique et deux clips à vis. Ce système permet d'assurer une bonne étanchéité entre les différents éléments. Un microscope comprenant une caméra reliée à un ordinateur permet de prendre des photos et d'enregistrer des séquences vidéo au cours de l'assemblage.

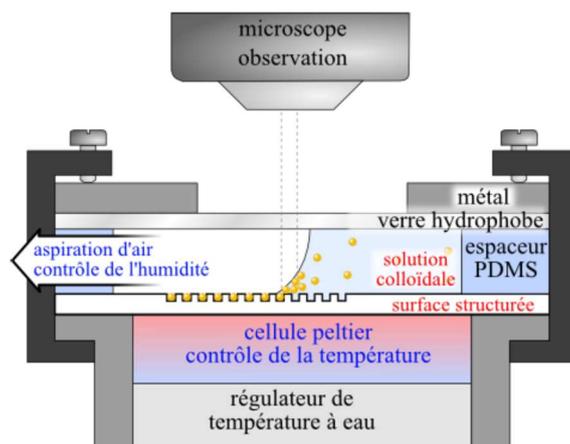


Figure 4.14 : Schéma du montage expérimental utilisé pour l'assemblage thermodynamique⁸⁵.

Nous allons réaliser un assemblage de microbilles PS de diamètre 10 μm en utilisant le dispositif expérimental décrit ci-dessus et étudier ses performances pour connaître son efficacité pour des particules micrométriques. L'échantillon microstructuré mesure 15 mm^2 et contient 2680 motifs (puits carrés de dimensions : 15 μm *15 μm *8 μm). Un volume de 50 μl de suspension de microbilles à la concentration de 1,5.10⁵ microbilles/ml est injecté à l'intérieur de la cellule à l'aide d'une seringue.

L'évaporation de la suspension de microbilles est amorcée en augmentant la température de l'échantillon (45 °C) et en régulant le taux d'humidité de la cellule (débit d'aspiration d'air de 40 ml/min).

4.2.2 Observations et résultats

L'assemblage se déroule en 2 étapes. Premièrement, on remarque que les microbilles se déplacent vers l'interface triple qui est immobile. Dans un deuxième temps, cette interface se déplace et balaye la surface de l'échantillon en piégeant les microbilles dans les microstructures. Cette observation est conforme avec les principes physiques décrits ci-dessus. Lorsque la ligne triple a balayé la totalité de la zone d'assemblage, le reliquat de liquide est extrait grâce à une seringue. Finalement, l'échantillon est enlevé du dispositif, séché et observé au microscope pour être analysé. Le temps de procédé est d'une heure.

À présent, l'échantillon va être analysé pour mesurer la qualité de l'assemblage. Nous avons défini une grandeur afin de caractériser la qualité de chaque assemblage. Le taux d'assemblage t_A est le ratio entre le nombre de motifs contenant une microbille N_m et le nombre de motifs totaux N_{tot} (4.1). Ce ratio représente la part de motifs contenant une microbille. À l'inverse, nous définissons le taux de défauts (4.2), c'est la part de motifs comprenant un défaut ou un excès de microbilles. Par exemple, le schéma de la figure 4.15 présente 20 microstructures ($N_{\text{tot}} = 20$) dont 16 contiennent une microbille ($N_m = 16$), par conséquent le taux d'assemblage est de 0,8 pour un taux de défauts de 0,2 en utilisant les relations 4.1 et 4.2.

$$t_A = \frac{N_m}{N_{\text{tot}}} \quad (4.1)$$

$$t_D = 1 - t_A \quad (4.2)$$

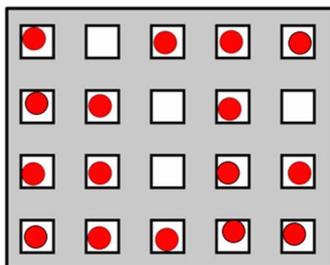


Figure 4.15 : Schéma représentant un échantillon après assemblage. Sur les 20 motifs, 16 ont piégés une microbille. $N_m = 16$, $N_{tot} = 20$ et $t_A = 0.8$, $t_D = 0.2$.

La figure 4.16a est une photo microscope de l'échantillon assemblé. Nous allons décrire la méthode d'analyse des images obtenus au microscope pour établir le taux d'assemblage d'un échantillon. Premièrement, plusieurs images ont été prises à l'aide d'un microscope optique et couvrent plus de 10 % de la surface assemblée. Ces images sont collectées pour calculer une moyenne du taux d'assemblage. L'analyse d'images est effectuée par le logiciel « ImageJ » qui possède un module d'analyse de particules. L'image (figure 4.16a) est convertie en une image 8 bits en noir et blanc. Puis, nous procédons à une optimisation du contraste et à une binarisation. Nous utilisons le module d'analyse de particules qui détecte et mesure le nombre de particules (microbilles sur l'image) ayant la taille prédéfinie. Le logiciel attribue un nombre de microbilles mesurées par image et une carte qui montrant la position des microbilles (en blanc sur fond noir) pour chaque image analysée. La dimension de l'image nous renseigne sur le nombre total de motifs et permet de calculer le taux d'assemblage. La figure 4.16b montre la carte des microbilles détectées par le logiciel correspondant à la figure 4.16a. La moyenne des images analysées indique que 2546 microbilles ont été assemblées sur 2680 motifs ce qui correspond à un taux d'assemblage égal à 0,95.

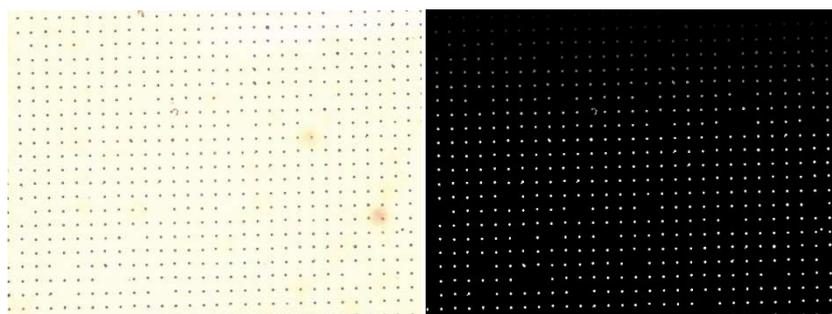


Figure 4.16 : **a)** image microscope de l'échantillon de microbilles PS (10µm) assemblées, **b)** reconnaissance et comptage des microbilles grâce au logiciel de traitement d'image ImageJ.

Dans le cadre de notre projet d'application biomédicale, notre objectif est d'assembler 400 fois plus de microbilles (10^6) le plus rapidement possible. Un tel échantillon doit avoir une surface de 324 mm², en supposant que le pas du réseau 2D soit au moins égal à 18 µm. Cela correspond à 10 fois la taille de l'échantillon utilisé. Par extrapolation, le temps nécessaire pour l'assemblage de 10^6 microbilles serait de 10 h, ce qui rendrait notre méthode de diagnostic d'allergies non-compétitive par rapport aux techniques existantes en termes de temps

d'exécution. Par conséquent, il n'est pas possible d'utiliser cette technologie pour un assemblage rapide (< 2 h). Ceci constitue un verrou technologique au développement d'un procédé d'auto-assemblage de microbilles rapide.

Cette technologie est principalement utilisée pour l'assemblage de particules colloïdales dont la taille varie entre (5 nm et 10 µm). Une particule peut être considérée comme colloïdale lorsque son diamètre est inférieur à un diamètre critique appelé limite colloïdale D_{col} défini par l'équation 4.3^{100,101}. Le tableau 4.1 indique les diamètres critique pour différents matériaux.

$$D_{col} \approx 3.45 \left(\frac{k_B T \mu^2}{\rho (\Delta\rho)^2 g^2} \right) \quad (4.3)$$

Matériau	ρ (10^3 kg/m^3)	D_c (μm)
PS	1.05	30
SiO ₂	2	11
Au	19.3	4

Tableau 4.1 : Diamètre critique de sédimentation à 25°C dans l'eau pour 3 matériaux: polystyrène, silice et or.

Lorsque $D < D_c$, on considère que la sédimentation est un phénomène négligeable par rapport au mouvement brownien. Toutefois, lors de cet assemblage de microbilles PS de diamètre 10 µm ($D < D_c$) nous avons constaté l'inverse, les microbilles sédimentent rapidement (< 10 minutes) et la variation d'amplitude du déplacement des microbilles, du au mouvement brownien, est faible par rapport à leur diamètre (< 2 µm). A cette taille il n'est pas utile d'utiliser les forces de capillarité pour déjouer le mouvement brownien ; la force de gravité est suffisante pour piéger les microbilles à l'intérieur des motifs. En effet, le graphique de la figure 4.17 montre que pour un diamètre de 10 µm, les particules PS se trouvent dans un état intermédiaire entre l'état colloïdal (les particules restent en suspension) et l'état sédimenté (sédimentation instantanée). Contrairement aux deux autres états ni la force de gravité ni la force balistique brownienne n'est majoritaire. À partir de ce constat, nous avons décidé de mettre au point une technologie d'assemblage dite « gravitationnelle » en exploitant la sédimentation rapide des microbilles. L'objectif est de mettre en place un dispositif d'assemblage dédié aux microbilles PS de 10 µm permettant un procédé plus rapide sur de larges surfaces (330 mm²). Le gain de temps et de surface que nous procure la méthode gravitationnelle par rapport à la méthode thermodynamique sera évalué.

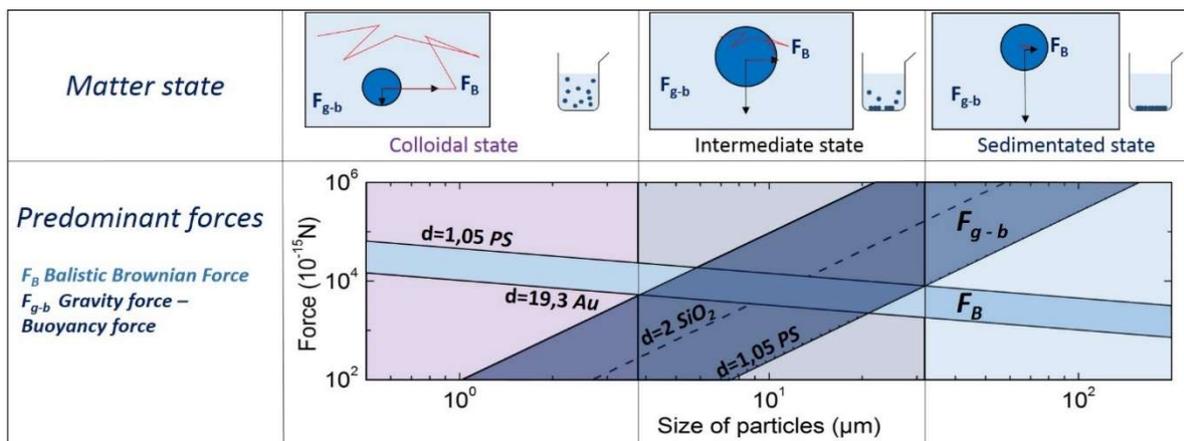


Figure 4.17 : Définition du comportement des particules plongées dans un liquide et de la force prédominante en fonction de la taille des particules.

Premièrement, nous nous sommes intéressés à l'assemblage thermodynamique. Le principe physique a été étudié, il a été montré que les forces hydrodynamiques et capillaires permettent aux particules d'être piégées dans les microstructures malgré le mouvement brownien. 2546 microbilles polystyrènes de $10\ \mu\text{m}$ ont été assemblées en 2 h sur une surface de $30\ \text{mm}^2$. L'évaporation a été déclenchée en établissant la température de l'échantillon à $45\ ^\circ\text{C}$ et un débit d'aspiration d'air à $40\ \text{ml/min}$ pour renouveler l'air au sein de la cellule fluïdique. L'analyse de l'échantillon est réalisée grâce au logiciel Image J qui permet l'analyse d'images microscope de l'échantillon après l'assemblage. Nous avons introduit le taux d'assemblage qui quantifie la part de microbilles assemblées. Une méthodologie a été détaillée pour la mesure du taux d'assemblage de l'échantillon. Les observations effectuées lors de l'assemblage montrent que la force gravitationnelle suffit à piéger les microbilles à l'intérieur des microstructures et que le phénomène de mouvement brownien n'est que très peu perceptible.

4.3 Développement de la technologie d'assemblage gravitationnel en 4 étapes

Dans la partie précédente, il a été montré que l'assemblage thermodynamique n'est pas adapté pour l'assemblage de microbilles PS $10\ \mu\text{m}$. Nous nous sommes ensuite orientés vers la technologie d'assemblage gravitationnel. Cette technologie repose sur le principe de piégeage des particules par sédimentation sur un échantillon microstructuré en phase liquide dans un milieu confiné.

Nous avons développé une technique d'assemblage gravitationnel en 4 étapes :

- Dissolution des bulles d'air.
- Sédimentation : dépôt des microbilles sur la surface de l'échantillon par gravitation.
- Piégeage thermique : déplacement des microbilles par variation de température.
- Balayage capillaire : retrait du liquide. Le liquide hôte est rapidement retiré pour ne laisser qu'une microbille par motif topographique.

4.3.1 Etape 1 : dissolution des bulles d'air

La microstructuration et l'hydrophobie de l'échantillon empêchent le liquide d'épouser la forme des microstructures. De l'air est alors piégé dans les microstructures entre l'échantillon et la couche de liquide présente au-dessus (figure 4.18). Le mouillage est dit « hétérogène », cette situation est modélisée par l'état de Cassie-Baxter¹⁰². Si les microstructures ne sont pas remplies de liquide, l'interface air – eau génère une force de capillarité d'immersion orientée vers le haut qui empêche la microbille d'atteindre le fond de la microstructure et d'être piégée. Pour réaliser l'assemblage, il est primordial de se débarrasser des bulles d'air et de rendre le mouillage « homogène ». Le mouillage homogène modélisé par l'état de Wenzel¹⁰² correspond à un liquide posé sur la surface rugueuse qui épouse la forme de la rugosité. L'objectif de cette étape est de déclencher la transition vers l'état de Wenzel par diminution de la température de l'échantillon. Le résultat est l'augmentation de la dissolution de l'air dans l'eau, les bulles d'air vont alors se dissoudre dans le liquide¹⁰³. La taille des bulles d'air diminuera progressivement avec la température jusqu'à leur disparition. À ce stade, les bulles d'air se sont dissoutes complètement dans le liquide. Cette étape est irréversible, car leurs nucléations dans le liquide sont énergétiquement défavorables. Par conséquent, une augmentation de température ne causera pas l'apparition de nouvelles bulles d'air.

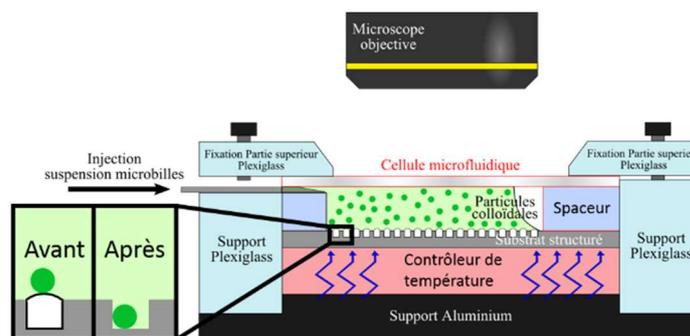


Figure 4.18 : Schéma de l'étape 1. La chute de température de l'échantillon déclenche la disparition des bulles d'air, piégées dans les microstructures, par dissolution.

Nous utilisons un échantillon microstructuré moulé en PDMS, chaque microstructure correspond à un site de piégeage pour une microbille. Des microsphères ayant un diamètre de 10 μm sont utilisées. Les motifs topographiques sont des cylindres creux de hauteur 10 μm et de diamètre 12 μm .

Il est nécessaire de préparer la suspension de microbilles. Pour un assemblage optimal, la concentration est fixée à $2 \cdot 10^6$ microbilles/ml pour un échantillon contenant 10^6 micro-puits. Ce ratio sera justifié dans la partie 4.4. Un détergent de synthèse (Triton X-100) est ajouté pour augmenter la mouillabilité et diminuer l'angle de contact eau/PDMS au ratio volumique de 1/10 000. Cela permettra d'obtenir un angle de contact optimal de 45° afin que les forces de capillarité aient la meilleure orientation possible durant l'étape de retrait. Dans un premier temps, nous déposons l'échantillon de PDMS sur le module à effet Peltier. Puis le haut de la cellule fluidique (espaceur + lame de verre) est placé sur cet échantillon. Un système de fixation en plastique assure l'étanchéité entre l'échantillon et l'espaceur grâce à 4 vis qui le lient au support. Le tout est placé sous le système de visualisation surmonté de la caméra connectée à l'ordinateur pour contrôler et observer le déroulement de l'assemblage.

Un volume de 750 μl de suspension de microbilles est injecté dans la cellule, la température est abaissée à 6 °C afin de procéder à l'étape 1 de dissolution des bulles d'air pendant 1 minute.

4.3.2 Etape 2 : sédimentation

L'étape 1 de dissolution des bulles d'air a été réalisée en diminuant la température de l'échantillon. Nous allons maintenant nous intéresser à l'étape de sédimentation.

Elle a lieu une fois que le liquide contenant les microbilles est injecté dans la cellule fluidique. La force de gravitation F_g entraîne les microbilles vers la surface de l'échantillon à la vitesse v_{sed} (figure 4.19). Afin d'obtenir un dépôt homogène sur toute la surface, l'échantillon est placé à température ambiante pour diminuer les flux de convection.

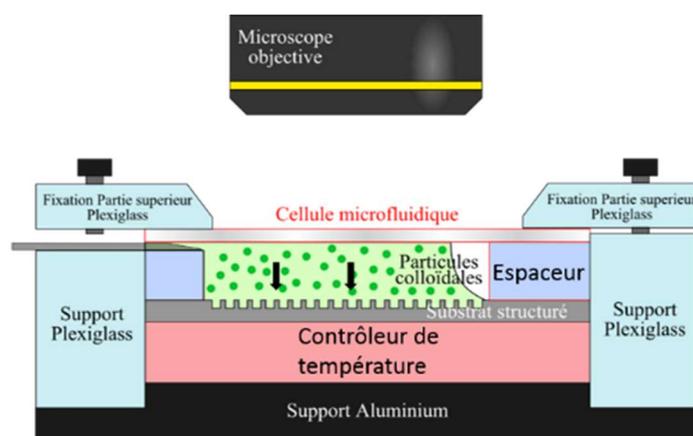


Figure 4.19 : Schéma de principe de l'étape 2 : Les microbilles se déposent sur l'échantillon grâce à la force de gravité F_g qui s'exerce sur les microbilles.

Comme expliquée dans la partie précédente, la sédimentation des microbilles est rapide. La vitesse de sédimentation d'une particule sphérique dans un liquide est décrite par la relation 4.4^{101,104}. Elle dépend de la masse volumique du fluide (ρ_f) et de celle de la microbille (ρ_m) en kg/m^3 , ainsi que de son diamètre (D) en m, g est la constante de gravité en m.s^{-2} et μ est la viscosité dynamique en Pa.s. Dans notre cas $D=10\mu\text{m}$, $\rho_m=1050\text{kg/m}^3$ et $\rho_f=1000\text{kg/m}^3$ et la vitesse de sédimentation calculée est $v_{sed}=2.73\mu\text{m/s}$.

$$v_{sed} = \frac{gD^2}{18\mu} (\rho_m - \rho_f) \quad (4.4)$$

Il est important de connaître la vitesse de sédimentation des microbilles utilisées pour connaître le temps de sédimentation établi par la relation 4.5 qui représente la durée de l'étape de sédimentation.

$$T_{sed} = \frac{18\mu}{gD^2} \frac{h}{(\rho_m - \rho_f)} \quad (4.5)$$

L'échantillon est mis à température ambiante pendant 6 minutes pendant le cours de l'étape de sédimentation.

4.3.3 Etape 3 : piégeage thermique

Après l'étape de sédimentation, les particules sont positionnées aléatoirement à la surface du substrat. Certains motifs contiennent une microbille alors qu'une majorité n'en contient pas. Pour optimiser le taux d'assemblage, il est nécessaire de maximiser le nombre de microstructures ayant une microbille avant l'étape de retrait de liquide. Un déplacement de microbilles est déclenché par augmentation de température. En effet, la différence de température entre le haut et le bas de la cellule provoque des instabilités thermiques de Rayleigh-Bernard¹⁰⁵ et génère des flux de convection au sein de la cellule fluide. De plus, l'augmentation de température génère également des instabilités thermo-capillaires de Bernard-Marangoni. La tension de surface du liquide diminue avec l'angle de contact. Par conséquent, la ligne triple va s'avancer et générer également des flux dans le liquide. La combinaison de ces deux effets déplace significativement les microbilles sur la surface de l'échantillon. La durée de cette étape dépend de la densité des microstructures, la concentration de particules initialement injectées et le taux d'assemblage souhaité. Ce phénomène génère des forces suffisamment grandes pour induire le déplacement des microbilles. Les microsphères roulent sur la surface du substrat en présence d'un flux dans une certaine direction décrit par la figure 4.20. Ce déplacement va augmenter la probabilité d'une microbille de se positionner au-dessus d'un motif et de tomber à l'intérieur.

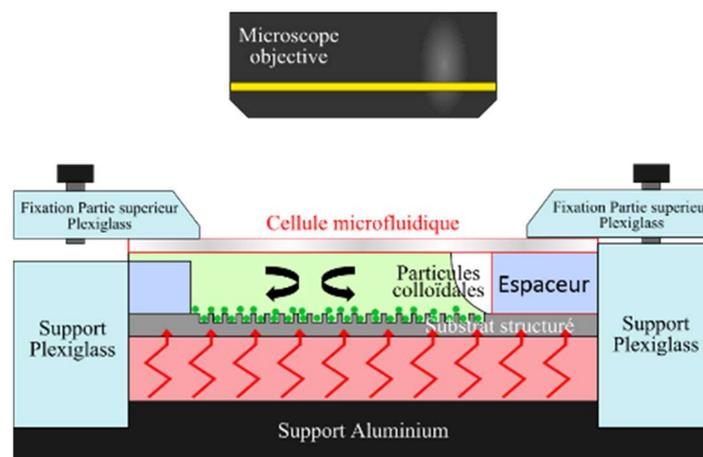


Figure 4.20 : Schéma montrant le principe de fonctionnement de l'étape 3. Les flux de convection causés par l'augmentation de température du substrat déplacent les microbilles à la vitesse V_{part} .

La température est réglée à 50 °C pour procéder à l'étape de piégeage convectif pendant 5 min. À la fin de cette étape, la plupart des microstructures sont remplies avec une microbille. Cela peut être vérifié grâce à la visualisation in-situ.

4.3.4 Etape 4 : Balayage capillaire

Lorsque l'étape de piégeage est terminée, une majorité des microstructures contiennent une ou deux microbilles. La deuxième étant en équilibre sur la première et le bord de la structure. L'objectif de cette dernière étape est d'extraire le liquide, et enlever les microbilles non piégées pour ne laisser qu'une microbille par puit. Le contrôle de la vitesse de retrait de liquide est

fondamental. Un retrait trop rapide serait violent et laisserait des particules non piégées sur l'échantillon alors qu'une faible vitesse rendrait l'assemblage moins rapide. Un compromis doit être trouvé entre rapidité et qualité d'assemblage pour cette étape.

Pour effectuer cette étape nous allons placer l'échantillon à température ambiante pour éviter les flux de convection. Puis le liquide est aspiré doucement en contrôlant le débit. La figure 4.21 montre que la ligne triple va balayer les motifs de la zone d'assemblage. Lorsque le ménisque de la ligne triple se déforme par la présence d'une microbille, il applique une force de capillarité qui pousse la microbille vers la sortie. Seules les microbilles non piégées ou en doublon seront entraînées par l'interface. Celles qui sont piégées seront bloquées au fond du puits par les parois latérales et resteront sur l'échantillon.

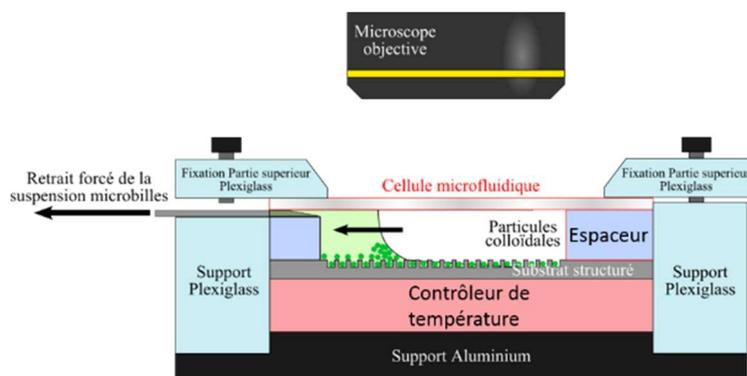


Figure 4.21 : Principe de l'étape 4 : l'aspiration du liquide à la vitesse V_f induit le recul de l'interface triple en balayant les microbilles non piégées et en ne laissant qu'une microbille par motif.

L'échantillon est placé à température ambiante, une seringue de 1 millilitre est placée sur un pousse-seringue. Un petit tuyau flexible connecte une aiguille à la seringue et permet de l'insérer à travers la préchambre de la cellule fluidique. Le pousse-seringue est programmé de sorte qu'il aspire $750 \mu\text{l}$ de liquide à la vitesse d'aspiration de $100 \mu\text{l}/\text{min}$.

Ensuite, la cellule fluidique est enlevée, l'échantillon est séché délicatement afin de retirer toute trace d'humidité pour qu'il puisse être analysé correctement. L'échantillon est analysé en utilisant le microscope optique.

L'échantillon est hydrophobe et présente une microstructuration. Par conséquent, de l'air se piège dans les micro-puits (modèle de Cassie-Baxter) ce qui empêche les microbilles d'être piégées. À l'inverse, l'état de Wenzel correspond à la situation où tous les puits sont remplis de liquide. Nous avons démontré qu'il est nécessaire de réaliser une transition entre ces deux états. Les bulles d'air sont éliminées par dissolution de l'air dans l'eau en diminuant la température de l'échantillon. La deuxième étape est la chute des microbilles vers l'échantillon par sédimentation. Nous avons établi les relations évaluant la vitesse et le temps de sédimentation. La troisième étape est le déplacement des microbilles à la surface de l'échantillon pour maximiser la probabilité de piégeage des microbilles. IL a été démontré qu'une augmentation de température de l'échantillon crée des instabilités thermiques qui génèrent des flux de convection déplaçant les microbilles. Finalement, la dernière étape consiste à retirer le liquide rapidement pour ne laisser exactement qu'une microbille par puits et obtenir un réseau 2D de particules

uniques. Les forces de capillarité entraînent les particules non piégées ou en excès contenues dans un motif.

4.4 Dispositif expérimental

Dans la partie précédente, nous avons vu la description et la caractérisation des 4 étapes de l'assemblage gravitationnel. Le passage de l'assemblage thermodynamique à l'assemblage gravitationnel exige de modifier le poste de travail. Nous nous sommes inspirés du montage expérimental utilisé pour l'assemblage thermodynamique pour concevoir une plate-forme dédiée uniquement à l'assemblage gravitationnel.

La mise en place du dispositif, la fabrication de ces constituants et le protocole expérimental utilisé seront décrits.

4.4.1 Description du dispositif expérimental

L'objectif est de mettre en place une plate-forme expérimentale fonctionnelle pour l'assemblage gravitationnel (figure 4.22). Lors de la description des étapes, il a été souligné qu'il faut confiner le liquide sur l'échantillon, contrôler la température (au-dessus et en dessous de la température ambiante) et le débit d'aspiration du liquide. Pour y parvenir, le dispositif est composé des constituants suivants :

- Une partie fluidique (D) : c'est l'élément principal du dispositif, c'est à l'intérieur de celle-ci que l'assemblage est réalisé. Il est composé d'un échantillon structuré (5) et d'une cellule fluidique (4). Un module thermoélectrique à effet Peltier (2) permet de réguler la température de l'échantillon au-dessus et en dessous de la température ambiante. Il est placé sur un support en aluminium (1) pour la diffusion de chaleur. L'ensemble est encastré dans un support PVC (3) pour fixer les constituants entre eux et assurer son étanchéité.
- Un pousse-seringue programmable (C) contrôle le débit d'aspiration et d'injection du liquide. La seringue utilisée est reliée à la cellule fluidique par un flexible.
- Le système de visualisation pour observer l'assemblage est constitué d'une colonne Mitutoyo et d'un jeu d'objectif de grossissement X5 et X10 (B). Une caméra, reliée à un ordinateur, est fixée sur la colonne pour permettre l'observation de l'assemblage.
- Un générateur (E) alimente le module à effet Peltier (2), la polarisation doit être changé en fonction de son mode d'utilisation (chauffer ou refroidir l'échantillon).
- Une source de lumière (A) illumine l'échantillon (5) via une fibre optique.

Composants de la partie fluidique

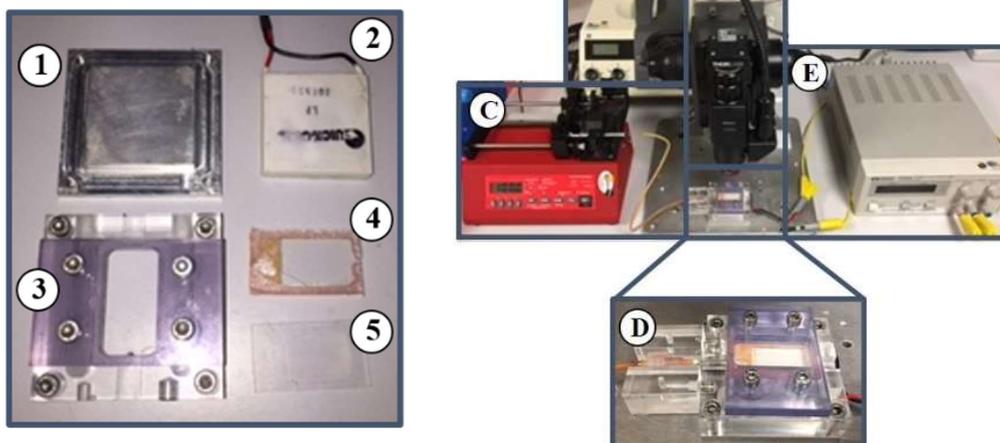


Figure 4.22 : Image du dispositif d'assemblage spécialement dédié pour la réalisation d'assemblage gravitationnel.

4.4.2 Fabrication de la cellule microfluidique

Dans le but d'assembler 10^6 microbilles, nous avons modifié la taille de l'échantillon, la surface d'assemblage est à présent de 330 mm^2 ($15 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$). Cela exige de modifier la taille de tous les composants de la cellule fluidique. Ainsi, l'échantillon (5), le module à effet Peltier, l'espaceur et la lame de verre (4) sont plus grands que pour l'assemblage thermodynamique. Nous allons décrire les différentes étapes de conception de la cellule fluidique. Premièrement, l'espaceur et l'échantillon en PDMS sont réalisés séparément. La lame de verre et l'espaceur sont ensuite liés par plasma air et déposés sur l'échantillon pour former la cellule microfluidique.

4.4.2.1 Réalisation de l'espaceur de PDMS

L'espaceur est une pièce moulée en PDMS, de dimension semblable à la lame de verre qui se fixe à sa surface. Ensemble (4), ils confinent le liquide sur l'échantillon (5). Le moule de l'espaceur a été dessiné à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur 3D : SolidWorks. Le design, présenté par la figure 4.23, intègre 2 chambres : une chambre principale dite « d'assemblage » (a) de dimension 25 mm par 17 mm et 1 mm de hauteur. C'est à cet endroit que le liquide sera en contact direct avec l'échantillon. La préchambre (b) est de dimension 8 mm par 17 mm et 0.1 mm d'épaisseur. Le concept de préchambre est utilisé par la start-up Smart Force Technologies et a fait l'objet d'un brevet⁹⁹ pour leur dispositif d'assemblage thermodynamique commercialisable. Elle permet de contrôler le remplissage sans toucher le bord opposé à la préchambre par capillarité grâce à son épaisseur très faible ($0,1 \text{ mm}$). Deux ouvertures ont été dessinées : la première est placée du côté de la préchambre et permet l'insertion de l'aiguille pour l'injection et l'aspiration de liquide. La deuxième ouverture joue le rôle d'évent pour que l'air puisse circuler lors du remplissage ou de l'aspiration du liquide et éviter une dépression/surpression au sein de la cellule fluidique.

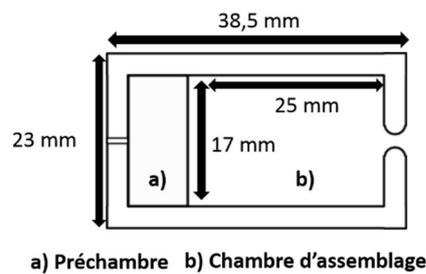


Figure 4.23 : Schéma technique de l'espaceur

Dans un premier temps, le moule en téflon a été usiné à l'aide d'une fraiseuse numérique de la société Cielle. Le moule est constitué de deux pièces de téflon qui s'emboîtent et dont le serrage est maintenu avec 6 vis.

Dans un deuxième temps, la solution de PDMS est préparée. C'est un polymère thermo-réticulable qui est très utilisé dans le domaine de la micro-fluidique. Ce polymère, vendu en kit (Sylgard 184) est préparé en mélangeant un monomère avec un agent réticulant dans un ratio massique de 10 : 1. Après agitation mécanique du mélange pour le rendre homogène, une étape de dégazage est nécessaire pour évacuer les bulles d'air emprisonnées lors de l'agitation. Après dégazage total, une petite quantité du mélange est versée à l'intérieur du moule en téflon. Le tout est chauffé à la température de 100 °C pendant 4 h. Après refroidissement, l'espaceur est prêt à être fixé sur la lame de verre.

4.4.2.2 Fabrication de la cellule fluidique

La cellule fluidique est assemblée en fixant l'espaceur sur la lame de verre. Tout d'abord, la lame de verre (37 mm*22 mm) est nettoyée à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée en volume égal pour enlever les déchets organiques présents sur la surface. L'espaceur est nettoyé dans des solutions d'acétone et d'isopropanol. Après séchage, la lame de verre et l'espaceur sont placés dans un bâti de gravure ionique réactive (Plassys) afin de subir un plasma oxygène pendant 10 secondes. Les faces oxydées de la lamelle de verre et de l'espaceur sont mises en contact. Le plasma d'oxygène va avoir pour effet de générer un couplage covalent irréversible entre ces deux éléments. L'intérêt est d'avoir une cellule parfaitement hermétique pour éviter toutes infiltrations après le remplissage par la suspension de microbilles. Finalement, la cellule est rendues hydrophobes en réalisant un traitement de surface par chimisorption d'une couche d'Optool DSX (Daikin Industries)⁸⁵.

4.4.2.3 Fabrication de l'échantillon

L'objectif est de fabriquer un échantillon microstructuré en PDMS contenant 10^6 micro-puits de profondeur 10 μm sur une surface de 330 mm^2 (15 mm* 25 mm). La taille totale de l'échantillon est de 40 mm par 25 mm. La figure 4.24 indique le procédé de fabrication de la microstructuration de l'échantillon.

Nous allons tout d'abord fabriquer le moule de silicium en effectuant une lithographie optique pour créer un masque dur en aluminium par un procédé de lift-off¹⁰⁶ puis de gravure ionique réactive profonde DRIE (Deep Reactive Ion Etching). Le masque en chrome utilisé est un réseau de motifs circulaires laissant passer la lumière. Premièrement, 1 μm d'une résine photosensible positive AZ1512 est étalé sur un wafer de silicium 4 pouces. La résine est insolée à la longueur d'onde 365 nm à travers le masque chrome. Après développement, on obtient un réseau de micro-puits à travers la résine. Une couche de 100 μm de chrome est déposée puis on réalise un lift-off qui dégrade la résine. On obtient un masque dur en aluminium permettant une DRIE par plasma SF_6 et CHF_3 . Le résultat final est un réseau de micro-plots de 10 μm de hauteur dans le silicium. Le moule produit est stable aux solvants et aux hautes températures (200 °C) permettant de multiples utilisations sans être altéré.

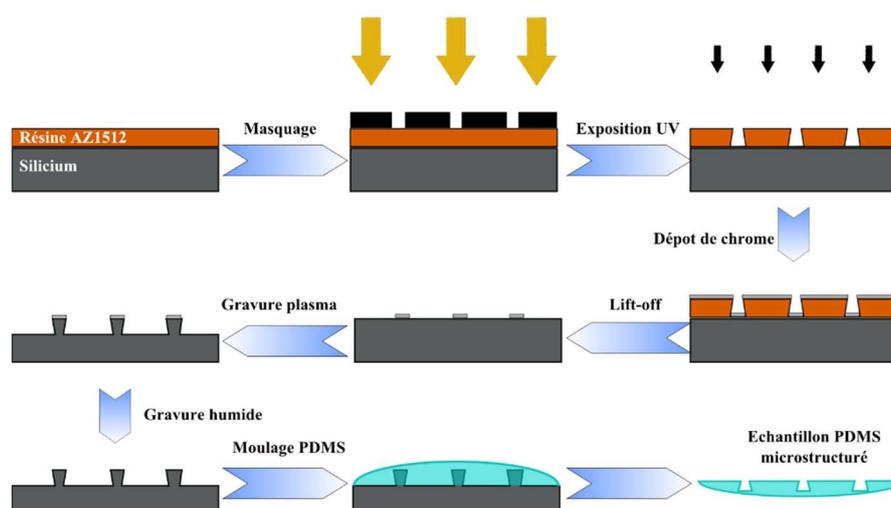


Figure 4.24 : Schéma du procédé de fabrication de l'échantillon de PDMS.

Le PDMS est coulé sur le moule qui épouse les micro-puits en silicium, un recuit est effectué à 200 °C pendant 5 minutes. Après refroidissement, l'échantillon est décollé du moule, il possède la tonalité inverse du moule à savoir un réseau de micro-puits de profondeur 10 μm . La figure 4.25 est une photo montrant l'échantillon microstructuré fabriqué. La zone d'assemblage apparaissant opaque est de dimensions 15 mm par 22 mm ce qui correspond à une aire de 330 mm^2 . Cette large surface est mise en évidence par la présence d'un objet macroscopique sur la photo : une pièce de cinquante centimes.

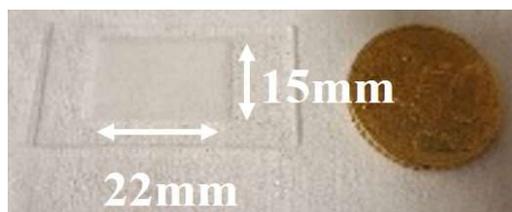


Figure 4.25 : Echantillon en PDMS (40mm*25mm) placé à côté d'une pièce de 50 centimes. La zone d'assemblage (opaque) au centre mesure 15mm*22mm.

*Le dispositif expérimental utilisé pour l'assemblage gravitationnel est décrit. La cellule fluïdique est reliée à un pousse-seringue pour l'injection et le retrait de liquide. L'échantillon est placé sur un module à effet Peltier pour contrôler la température au-dessus et en dessous de la température ambiante. Un système de visualisation est placé juste au-dessus pour observer l'assemblage in-situ. La cellule fluïdique est composée d'une lame de verre et d'un espaceur en PDMS moulé dans un moule en téflon. L'espaceur présente la particularité de posséder une préchambre qui permet d'optimiser le remplissage de la chambre principale. Ces deux parties sont fixées ensemble par une méthode de plasma O₂. La fabrication de l'échantillon microstructuré en PDMS est effectuée par une méthode de lithographie optique suivie d'une gravure plasma pour obtenir un moule silicium formé d'un réseau de micro-plots. Le transfert sur le PDMS donnera un réseau de micro-puits de dimension : 15 µm*15 µm*10 µm sur une surface totale de 330 mm² correspondant à 10⁶ motifs.*

4.5 Etude des points de fonctionnement

Après avoir décrit en détail le fonctionnement et la mise en place de cette technologie d'assemblage nous allons justifier les valeurs de certains paramètres mentionnés dans le protocole expérimental. Pour chaque étape, une étude sera réalisée pour déterminer le point de fonctionnement idéal pour un assemblage rapide et de qualité. Les paramètres concernés sont la température et la vitesse de retrait du liquide en ce qui concerne l'étape finale.

4.5.1 Etape 1

Pour caractériser cette étape nous avons réalisé l'étape de dissolution des bulles d'air à différentes températures : 6 °C, 12 °C, 18 °C et 25 °C (température ambiante). L'objectif est l'étude de l'influence de la température sur la vitesse de dissolution des bulles d'air. Le dispositif d'assemblage est placé sous un microscope en utilisant un objectif de grossissement X10. La figure 4.26 est une photo microscope de l'échantillon vue de dessus, avant (a) et après (b) l'étape 1. On remarque que les microstructures remplies d'eau apparaissent de la même couleur que l'échantillon alors que les microstructures contenant de l'air apparaissent blanches. Cette variation apparente de couleur nous permet de suivre l'évolution du nombre de motifs remplies d'eau afin de savoir à quel moment l'étape 1 est réalisée (aucun motif comprenant de l'air piégé).

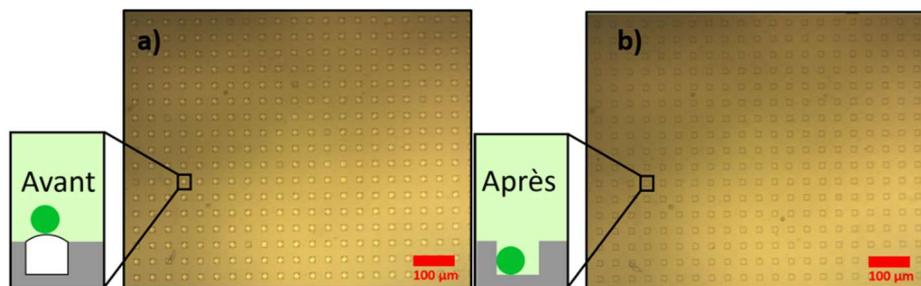


Figure 4.26 : Image microscope avant a) et après b) l'étape de dissolution des bulles d'air. Les motifs contenant une bulle d'air sont blancs et ils changent de couleurs (marron) après dissolution.

Des images sont enregistrées toutes les 5 secondes pour suivre l'évolution du pourcentage de microstructures ayant emprisonné une bulle d'air en fonction du temps. Les images sont analysées via le logiciel ImageJ et les résultats sont présentés sur un graphique de la figure 4.27. Il montre l'évolution de la proportion de microstructures remplies de liquide en fonction du temps à différentes températures de dissolution (6 °C, 12 °C, 18 °C et 25 °C). Lorsque la part de micro-puits rempli de liquide atteint 100 %, il n'y a plus d'air piégé et l'étape de dissolution est considéré terminée. Le graphique indique que plus la température de l'échantillon est basse plus cette étape est rapide. L'étape dure 45 secondes à 6 °C, 70 secondes à 12 °C et 220 secondes à 18 °C de façon à se débarrasser de toutes les bulles d'air piégés dans les motifs de l'échantillon. En revanche, on remarque qu'à température ambiante, seulement 30 % des motifs se remplissent d'eau au bout de 4 minutes. C'est la différence de température entre l'échantillon et l'air ambiant qui influe sur la vitesse.

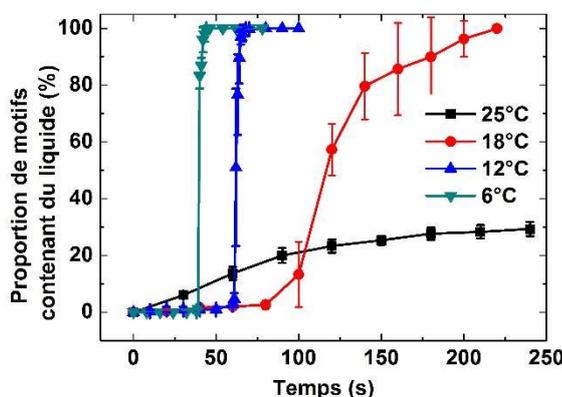


Figure 4.27 : Graphique montrant l'évolution de la dissolution des bulles d'air dans le liquide pour 4 températures différentes (6°C, 12°C, 18°C et température ambiante).

4.5.2 Etape 2

À présent, nous allons caractériser l'étape de sédimentation qui est réalisée à température ambiante. En effet, une différence de température entre le haut et le bas de la cellule génère des flux de convection qui déplacent les microbilles et peuvent se déposer préférentiellement à certains endroits occasionnant un dépôt non-homogène.

Nous avons réalisé une expérience pour valider expérimentalement la relation de vitesse de sédimentation. La cellule fluïdique a été placée sous un microscope, une suspension de microbille est injectée. Des images sont prises toutes les 5 secondes pour suivre l'évolution de la sédimentation. L'image est focalisée à la surface de l'échantillon de telle sorte que les

microbilles apparaissent nettes si elles ont sédimentées et floues si elles sont toujours en suspension. Lorsque toutes les microbilles ont atteint l'échantillon, la sédimentation est terminée et la vitesse de sédimentation en est déduite sachant que la hauteur de la cellule est de 1 μm . Nous avons réalisé ces mesures pour 3 tailles de microbilles PS et SiO_2 .

- PS : $D = 3 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ et $10 \mu\text{m}$
- SiO_2 : $2 \mu\text{m}$, $4.5 \mu\text{m}$ et $8 \mu\text{m}$

Les temps théoriques sont calculés en utilisant la relation 4.5. Le graphique de la figure 4.28 montre deux courbes représentant l'évolution de la vitesse de sédimentation pour deux matériaux différents : la silice tracée en rouge et le polystyrène tracé en noir. Les courbes en traits pleins correspondent aux valeurs théoriques alors que les triangles représentent les points expérimentaux. Les points expérimentaux (triangles) ont été placés sur le graphique suivant le même code couleur. Les microbilles SiO_2 sédimentent plus rapidement que les microbilles PS, car leur masse volumique est plus élevée que celle du PS ($M_{\text{PS}} = 1050\text{kg/m}^3$ et $M_{\text{SiO}_2} = 2000\text{kg/m}^3$). De plus, la vitesse de sédimentation (v_{sed}) diminue avec le diamètre de la microbille.

$$T_{\text{sed}} = \frac{18\mu}{gD^2} \frac{h}{(\rho_m - \rho_f)} \quad (4.5)$$

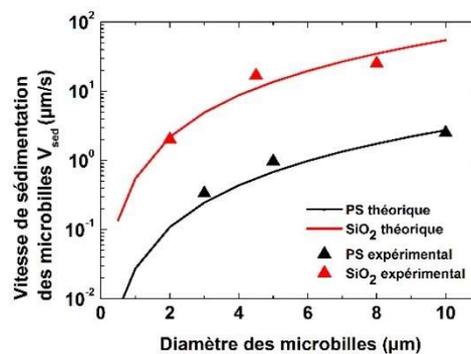


Figure 4.28 : Graphique montrant l'évolution de la vitesse de sédimentation des microsphères de polystyrène (noir) et de silice (rouge) en fonction de leurs diamètres.

4.5.3 Etape 3

Le déplacement des microbilles est causé par une augmentation de température de l'échantillon. Nous avons mesuré le déplacement moyen des microbilles en fonction de la variation de température. Une suspension de microbilles est injectée dans la cellule fluide qui a été disposée sous un microscope. Nous avons réalisé l'expérience avec des microbilles PS de diamètre 5 et 10 μm et des particules SiO_2 de diamètre 8 μm .

A l'origine la cellule fluide est à température ambiante, puis l'échantillon subit une augmentation de température (+5 $^{\circ}\text{C}$, +10 $^{\circ}\text{C}$, +15 $^{\circ}\text{C}$ et +20 $^{\circ}\text{C}$). La température s'établit instantanément à la surface de l'échantillon. Durant une minute, des images sont capturées toutes les 5 secondes pour suivre le déplacement des microbilles en fonction de la température.

La vitesse est calculée en mesurant le déplacement des microbilles entre chaque image. Pour chaque microbille, une vitesse moyenne est calculée et reportée sur le graphique (figure 4.29). Le graphique montre que la vitesse de déplacement des microbilles est proportionnelle à la variation de température. Sans variation de température (25 °C), les microbilles sont immobiles. A la température maximale (45 °C) la vitesse moyenne est de 0.6 $\mu\text{m/s}$. Cette vitesse permet aux microbilles de parcourir en une minute une distance moyenne équivalente à 2 fois le pas du réseau (18 μm). Le nombre de microbilles piégées est alors augmenté significativement. Nous ne pouvons pas appliquer une température plus élevée que 45 °C, car cela altère l'étanchéité de la cellule et rends la solution trouble lié à la formation de micelles (Triton X-100).

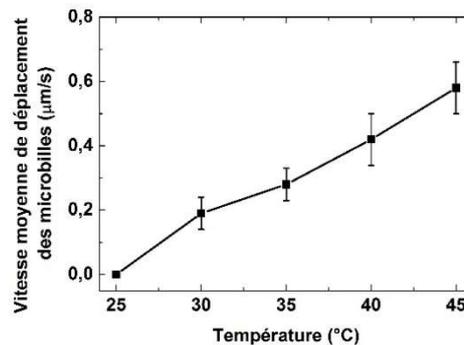


Figure 4.29 : Graphique montrant l'évolution de la vitesse de déplacement des microbilles en fonction de la température appliquée sur l'échantillon.

4.5.4 Etape 4

L'influence du débit de retrait du liquide a été étudiée pour différentes concentrations de microbilles sur le taux d'assemblage. 4 débits de retrait de liquide différents (0.01, 0.1, 1 et 10ml/min) ont été choisis. Le ratio de microbilles (R_m) est le rapport entre le nombre de microbilles injectées et le nombre de microstructures. Pour chaque débit, nous avons réalisé un assemblage avec trois R_m différents (1, 2 et 5). Les échantillons sont ensuite séchés et analysés à l'aide d'un microscope optique pour compter le nombre de microbilles assemblées et en déduire le taux de défauts grâce au logiciel ImageJ. La figure 4.30 montre que le débit de retrait n'a pas d'influence sur le taux de défauts (> 99 %) lorsque l'échantillon est saturé en microbilles ($R_m=2.5$). Cependant, il a une influence pour $R_m=1$ et $R_m=0.5$, le taux de défauts augmente avec le débit de retrait de liquide. Cela prouve que l'étape de retrait peut être effectuée en quelques secondes si l'échantillon est saturé en microbilles. Lorsque l'assemblage n'est pas effectué à saturation de microbilles, il est préférable de choisir un débit de retrait faible (10 – 100 $\mu\text{l/min}$). L'étape de retrait par balayage capillaire ressemble au déplacement de la ligne triple de l'assemblage thermodynamique. Cependant, le déplacement de la ligne triple n'est pas causé par l'évaporation, mais juste par le retrait du liquide, par conséquent l'assemblage est beaucoup plus rapide.

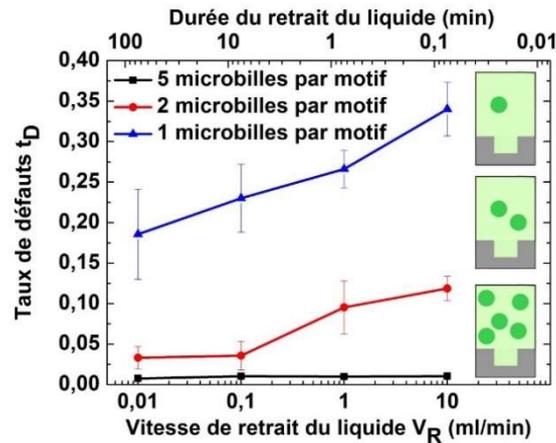


Figure 4.30 : Courbes d'évolution du taux de défauts des assemblages en fonction de la vitesse d'aspiration V_L et de la quantité de microbilles injectées dans la cellule fluïdique.

La caractérisation de chaque étape montre les points de fonctionnement optimums pour obtenir un procédé le plus rapide (10 min) possible avec un taux d'assemblage élevé (0,99). L'influence de la température a été étudiée pour chaque étape ainsi que le débit de retrait du liquide pour l'étape finale.

Dans cette partie, nous avons étudié les points de fonctionnement pour chaque étape. Afin d'obtenir un assemblage rapide présentant un taux d'assemblage élevé, les paramètres critiques ont été identifiés et analysés. Lors de l'étape 1, le paramètre clé est la température, A 6 °C l'étape de dissolution des bulles d'air est rapide (1 minute). Durant l'étape 2, nous avons identifié que l'apport de chaleur est néfaste, car elle génère des flux de convection durant la sédimentation. Cette étape doit se faire à température ambiante pour éviter une sédimentation non-homogène. La vitesse de sédimentation des microbilles a également été mesurée pour connaître la durée de cette étape (6 minutes). La température est un paramètre clé pour l'étape 3. Il a été montré que la vitesse des microbilles est proportionnelle à la variation de température entre le haut et le bas de la cellule. Cependant, une température trop importante cause des problèmes d'étanchéité et de cristallisation du tensioactif utilisé. Pour l'étape 4, deux paramètres ont été pris en considération. Premièrement, la vitesse de retrait du liquide a une influence sur le taux d'assemblage. Une vitesse élevée ($> 1\text{ml/min}$) augmente le nombre de défauts alors qu'une vitesse faible ($< 1\text{ml/min}$) cause moins de défauts, mais le temps de procédé est plus long.

4.6 Performances de la technologie d'assemblage gravitationnel

À partir des études précédentes sur la cellule d'assemblage gravitationnel et des 4 étapes, nous avons déterminé des points de fonctionnement optimums. Le taux d'assemblage, le taux de défauts et la durée d'assemblage sont les 3 paramètres importants du procédé. Dans cette partie, un test de rapidité sera réalisé pour évaluer le temps d'assemblage minimal. Puis l'influence de la concentration de microbilles injectées sur le taux d'assemblage sera étudiée. Enfin, nous

effectuerons des expériences afin de prouver que le concept d'assemblages successifs effectués sur un même échantillon diminue considérablement le taux de défauts.

Un assemblage a été réalisé pour connaître la vitesse d'exécution de cette technologie et validée son utilisation dans le cadre de notre application du diagnostic des allergies. Le cahier des charges indiqué dans le chapitre 1 a été pris en compte : assembler 10^6 microbilles en réseau 2D en moins de 30 minutes. Le protocole expérimental décrit dans la partie précédente a été utilisé. Après assemblage, l'analyse montre que le taux d'assemblage a atteint une valeur supérieure à 0.99 en 10 minutes (figure 4.31a). L'image MEB prise à incidence rasante (figure 4.31b) montre le positionnement des microbilles dans les motifs après assemblage. Cette image confirme que la hauteur des motifs est égale aux diamètres des microbilles. Ainsi, la technologie d'assemblage gravitationnel permet de positionner des microbilles polystyrènes de 10 μm en moins de 10 minutes avec un taux d'assemblage supérieur à 0.95. Le verrou technologique a été débloqué et autorise l'intégration de cette méthode dans notre précédé de diagnostic des allergies.

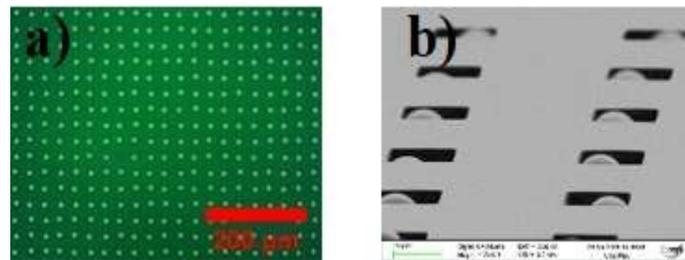


Figure 4.31 : Assemblage de microbilles polystyrènes 10 μm fluorescentes par a) microscopie à fluorescence, b) microscopie électronique à balayage (MEB).

4.6.1 Etude de l'influence de la concentration de microbilles sur le taux d'assemblage

Nous avons effectué des assemblages différents en variant la concentration initiale de microbilles injectées dans la cellule, représentés par le ratio R_m . C'est le ratio entre le nombre de microbilles injectées et le nombre de motifs. Le protocole expérimental décrit précédemment est utilisé. Les échantillons contiennent 70 000 motifs (15 μm *15 μm *10 μm) pour les billes de 10 μm et 1 077 371 motifs (7.5 μm *7.5 μm *5 μm) pour les billes de 5 μm . L'objectif est de caractériser l'évolution du taux d'assemblage en fonction de la concentration initiale. Cette caractérisation nous permettra par la suite d'estimer la concentration d'une suspension de microbilles à l'aide d'un assemblage gravitationnel. Les résultats sont présentés sur le graphique de la figure 4.32, les courbes décrivant les taux d'assemblage pour les microbilles polystyrènes 5 μm et 10 μm y sont tracés sur une échelle log/log. La concentration a une influence sur le taux d'assemblage. Nous avons extrait des courbes 3 comportements différents que nous avons délimités en zone de travail.

- **Zone de détection** : cette zone permet la détection de très faible concentration de microbilles ($R_m < 10^{-4}$), le taux d'assemblage est très faible. Le graphique montre que même à ces très faibles concentrations, le taux d'assemblage n'est pas nul ainsi, il est possible de détecter la présence de microbilles malgré leur faible nombre. La limite de détection atteint 2 microbilles/ml pour les 2 tailles utilisés : 10 μm et 5 μm .

- **Zone de comptage** : nous nous situons à des concentrations intermédiaires ($10^{-4} < R_m < 2$). Dans cette zone, le taux d'assemblage est proportionnel à la quantité de microbilles injectées. Cette relation est linéaire et permet le comptage de microbilles. Dans cette zone, la courbe tracée s'apparente à une droite et il est possible d'estimer la concentration de la suspension de microbilles à partir du taux d'assemblage.
- **Zone d'assemblage** : enfin, des assemblages présentant des taux de défauts très faible (< 0.01) ont été réalisés pour des fortes concentrations de microbilles ($R_m > 2$). Le graphique montre que la courbe du taux d'assemblage décrit une asymptote : $t_A = 1$. Un régime de saturation est atteint, car le taux d'assemblage est très proche de 1. Les microbilles sont en excès par rapport aux microstructures. Cette saturation est atteinte expérimentalement pour $R_m = 2$, ce qui est en accord avec nos observations précédentes d'une particule sur deux assemblées (limite de détection de 2 microbilles/ml).

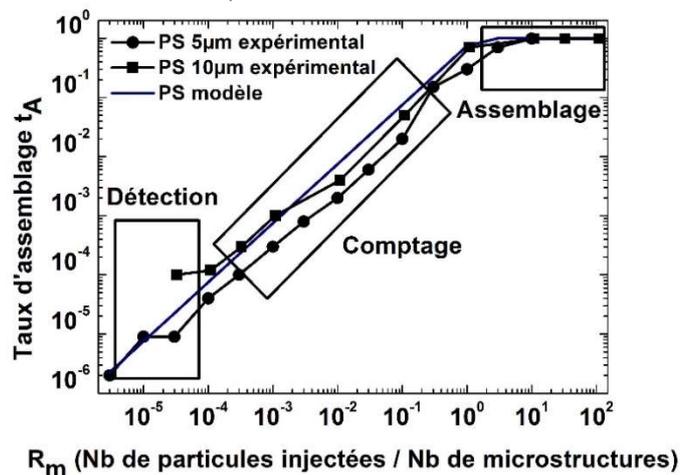


Figure 4.32 : Graphique indiquant l'évolution du taux d'assemblage t_A en fonction du ratio R_m .

4.6.2 Réalisation d'assemblages successifs

Nous avons mis en place une série d'expériences pour étudier l'influence des assemblages successifs sur le taux d'assemblage t_D pour deux vitesses de retraits du liquide différents (10ml/min et 100µl/min). Les assemblages sont réalisés en utilisant le protocole expérimental décrit dans la partie précédente.

Premièrement, un assemblage est réalisé sur un échantillon comportant 1 077 371 microstructures avec une concentration de microbilles égale à $2 \cdot 10^6$ part/ml. Après l'étape de retrait du liquide, l'échantillon est séché puis analysé au microscope afin de calculer le taux de défauts t_D . Puis, l'assemblage est effectué de nouveau sur le même échantillon en utilisant une nouvelle suspension de microbilles présentant la même concentration. À chaque itération, l'assemblage est réalisé suivant le même protocole et le taux de défauts est mesuré à l'aide d'un microscope optique. Nous avons effectué cinq assemblages successifs avec un débit de retrait du liquide de 100 µl/min et 10 ml/min. Les résultats sont présentés sur le graphique de la figure 4.33 où est représenté le taux d'assemblage en fonction du nombre d'assemblages successifs réalisés. Deux courbes pour deux valeurs de débit d'aspiration ont été tracées et montrent que les assemblages successifs diminuent significativement le taux de défauts qui varie de 0.95 (1^{er} assemblage) à 0.9995 (4^{ème} itération) pour un débit d'aspiration de 10 ml/min. Il varie de 0.995

(1^{er} assemblage) à 0.99995 (4^{ème} itération) pour un débit d'aspiration de 100µl/min. De plus, le graphe montre que le taux de défauts diminue avec le débit d'aspiration. Le graphe montre que la valeur de t_D est la plus faible pour la plus faible valeur du débit d'aspiration. La diminution de t_D est plus importante lors des deux premières itérations que lors des deux dernières. Cette expérience montre que l'utilisation d'assemblages successifs permet de réduire t_D par 3 ordres de grandeur. Comme la durée d'exécution est plus importante, un compromis doit être trouvé entre le taux de défauts et temps d'assemblage. Dans notre cas, le temps d'assemblage est un paramètre plus important que la qualité d'assemblage. De plus, même sans avoir recours aux assemblages successifs, le taux d'assemblage est de 0,99.

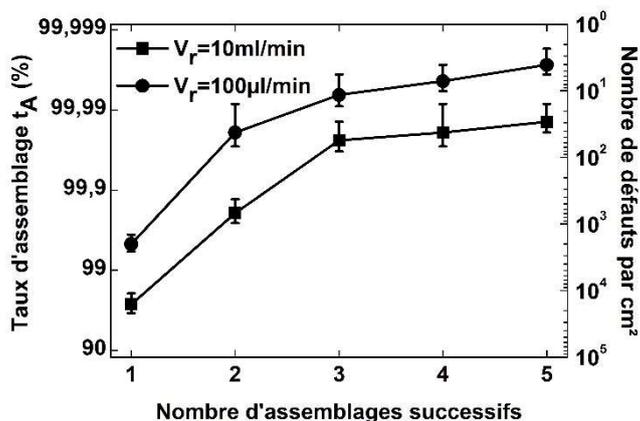


Figure 4.33 : Graphique montrant l'évolution du taux d'assemblage en fonction du nombre d'assemblage successifs effectués sur un même échantillon pour deux vitesses de retraits de liquide V_r différentes.

Nous avons comparé la vitesse d'assemblage maximale réalisée par la technologie d'assemblage gravitationnelle par rapport aux autres technologies de l'état de l'art. Les vitesses surfaciques d'assemblage des différentes techniques de l'état de l'art ont été reportées sur le graphique de la figure 4.34 pour les comparer avec la vitesse surfacique (en mm²/min) maximale atteinte lors d'un l'assemblage gravitationnel. On constate que la vitesse surfacique est d'un ordre de grandeur plus élevé que pour les autres technologies conventionnelles.

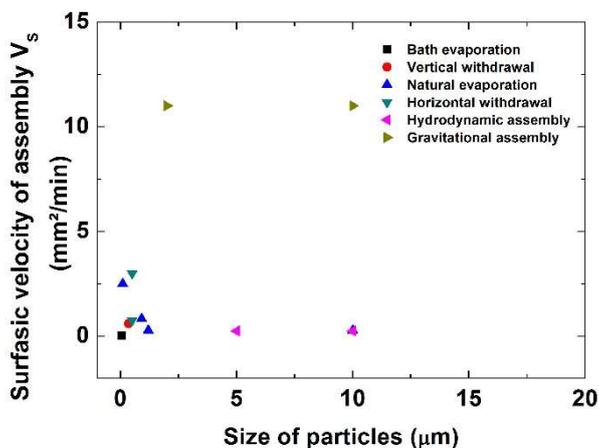


Figure 4.34 : Vitesse surfacique d'assemblage en fonction de la technologie utilisée et de la taille des particules.

Nous nous sommes intéressés aux performances de la technologie d'assemblage gravitationnel. Tout d'abord, il a été montré que cette technologie possède une limite de détection de 2 microbilles/ml. L'avantage de cette technique est que le taux d'assemblage est proportionnel à la quantité de microbilles injectées dans la cellule fluide. Ainsi, il est possible d'évaluer la concentration de microbilles d'une suspension inconnue. Lorsque l'échantillon est saturé en microbilles, les assemblages produits sont d'excellente qualité avec des taux d'assemblage supérieur à 0.99. Des assemblages successifs ont été expérimentés sur le même échantillon pour obtenir une meilleure qualité d'assemblage. En effet, le taux d'assemblage est augmenté de deux ou trois ordres de grandeur en réalisant 5 assemblages à la suite. Cependant, cette méthode allonge sensiblement la durée de procédé et ne peut être validée dans le cadre de notre application.

4.7 Conclusion

Nous avons développé une technologie d'assemblage de microbilles en 4 étapes pour un procédé rapide (15 min) et sur une grande surface (3,3 cm²). Les propriétés de sédimentation ont été exploitées pour élaborer un dispositif dédié. Les performances de cette technologie prouvent que le transfert technologique est réalisable.

Au cours de ce chapitre, les phénomènes mis en jeu et l'état de l'art des techniques d'assemblage de particules uniques ont été présentés.

Nous avons montré que l'assemblage thermodynamique est une technologie pertinente pour réaliser des structures en 2 ou 3 dimensions et pour positionner individuellement des particules colloïdales dont le phénomène de sédimentation ne peut être négligé. Cette technologie permet également l'assemblage de microbilles PS 10 µm cependant sa réalisation est trop chronophage pour l'inclure dans la technologie de diagnostic d'allergies par microbilles.

La technologie d'assemblage gravitationnel a été mise en place en développant une méthode divisée en 4 étapes qui a été brevetée. La dissolution de l'air piégé à la surface de l'échantillon microstructuré hydrophobe, la sédimentation des microbilles, le piégeage thermique et le balayage capillaire constituent les 4 phases de cette méthode.

Un montage expérimental dédié à l'assemblage gravitationnel a été élaboré. La partie fluide et l'échantillon ont été modifiés pour obtenir une surface d'assemblage de 330 mm². Un pousse-seringue a été inclus dans le dispositif pour contrôler le débit de retrait de l'étape 4. Nous avons détaillé le procédé de fabrication de la cellule fluide et de l'échantillon par combinaison des techniques de lithographie optique, gravure et moulage PDMS. Une preuve de concept a été apportée par la réalisation d'un assemblage de 10⁶ microbilles en moins de 30 minutes en établissant un protocole détaillé.

Nous avons étudié les points de fonctionnement de différents paramètres en réalisant diverses expériences au sein de la cellule fluide pour développer un procédé rapide (15 min) d'assemblage présentant un taux d'assemblage élevé (0.99).

Les performances et les limites de cette technologie ont été évaluées en étudiant l'influence de la concentration de microbilles et la mise en place d'assemblages successifs sur le taux d'assemblage.

Chapitre 5 : Utilisation de la technologie microbilles pour la détection d'anticorps spécifiques IgE

5.1	Préparation des analyses du sérum de patient.....	117
5.1.1	Analyse qualitative des sérums sensibles à l'arachide.....	117
5.1.2	Analyse quantitative des sérums de patient par technologie ImmunoCAP®.....	120
5.2	Détection des anticorps IgE sériques par la méthode microbilles.....	121
5.2.1	Description de la méthode.....	121
5.2.2	Lecture des résultats par assemblage gravitationnel.....	122
5.2.3	Lecture rapide des résultats par spectroscopie.....	126
5.3	Conclusion.....	129

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'analyse des sérums de patient par la technologie microbilles en utilisant le travail présenté dans les chapitres 2, 3 et 4 consacrés au développement des différentes technologies appliquées aux microbilles. La méthode est subdivisée en plusieurs étapes de biofonctionnalisation, de réaction avec le sérum de patient, de tri magnétique, d'assemblage gravitationnel et de lecture des résultats.

Dans un premier temps, les analyses de contrôle seront effectuées sur les extraits d'allergènes et les sérums de patient.

Puis, nous décrirons la méthode utilisée, le principe et les étapes détaillées de la technologie microbilles qui s'oriente vers le diagnostic des allergies développés au sein du laboratoire LTM. Des tests cliniques qualitatifs et quantitatifs seront effectués avec des sérums de patient sensibles à l'arachide, la noisette ou la crevette.

Les performances de notre outil de diagnostic seront évaluées et une comparaison des tests cliniques sera effectuée avec les technologies actuelles.

5.1 Préparation des analyses du sérum de patient

Tout d'abord, des tests de contrôle sont effectués sur les extraits d'allergènes et les sérums de patient pour s'assurer qu'ils sont bien réactifs entre eux.

5.1.1 Analyse qualitative des sérums sensibles à l'arachide

5.1.1.1 Etape 1 SDS-PAGE

Les extraits d'allergènes sont analysés avant l'étape de biofonctionnalisation par la méthode SDS-PAGE¹⁰⁷ (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). C'est une technique qui permet d'analyser les protéines contenues dans une solution par séparation en fonction de leur masse moléculaire sur un gel à base de polyacrylamide. Le laurylsulfate de sodium (SDS) est un détergent ionique qui a pour fonction de se fixer sur la chaîne polypeptidique de la protéine via sa longue chaîne carbonée grâce à des interactions hydrophobes. Cette molécule se fixe sur la protéine avec une proportion d'une molécule de SDS pour 2 acides aminés¹⁰⁸. Le groupement sulfate portant une charge négative, le complexe formé possède un nombre de charges proportionnel à la quantité d'acide aminé et à son poids moléculaire. L'électrophorèse de la solution de protéine est effectuée dans un gel polyacrylamide dont la taille des pores est contrôlée. Comme le montre la figure 5.1, une protéine de petite taille traverse les pores du gel plus rapidement et effectue une plus grande distance qu'une protéine de taille supérieure. Ainsi, les protéines sont séparées sur le gel en fonction de leur masse moléculaire. La coloration au bleu de Coomassie permet de visualiser directement les protéines qui forment des bandes protéiques. La distance parcourue par les protéines est révélée par la position des bandes protéiques sur le gel et indique le poids moléculaire des protéines isolées.

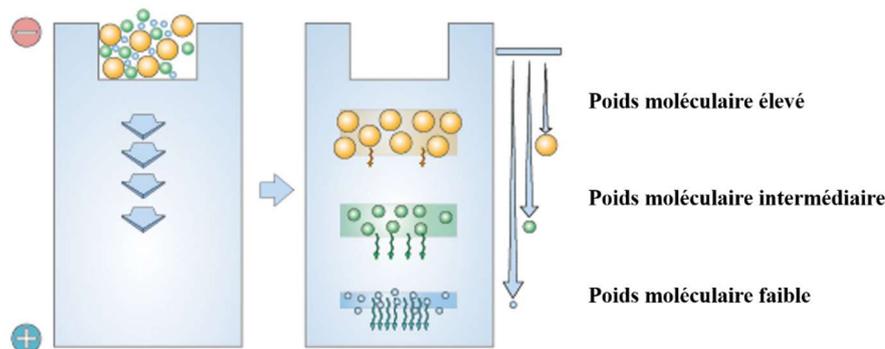


Figure 5.1 : Schéma de principe de l'électrophorèse.

Le tableau 5.1 présente les poids moléculaires des différents allergènes moléculaires de l'arachide dont la présence dans l'extrait d'allergène est nécessaire⁵⁸ pour un diagnostic efficace. Ces allergènes (*Ara h 1*, *Ara h 2*, *Ara h 3*, *Ara h 8* et *Ara h 9*) sont utilisés sous forme

pure par la technologie ImmunoCAP® pour détecter et évaluer la concentration des anticorps IgE spécifiques.

Allergènes de l'arachide	<i>Ara h 1</i>	<i>Ara h 2</i>	<i>Ara h 3</i>	<i>Ara h 8</i>	<i>Ara h 9</i>
Poids moléculaire (en kDa)	63.5	20	45	16.8	10

Tableau 5.1 : Poids moléculaire des allergènes indispensables au diagnostic de l'allergie à l'arachide.

La figure 5.2 montre le résultat du test SDS-PAGE sur l'extrait d'arachide fourni par le laboratoire de Toulouse. À gauche, on remarque la position des bandes protéiques (en bleu) révélant la présence de différentes protéines contenues dans l'extrait d'arachide. À droite, des repères ont été placés pour indiquer la masse des protéines exprimée en kDa. Les résultats révèlent la présence des allergènes cités précédemment dont la présence dans l'extrait d'allergène est indispensable pour le diagnostic d'allergies⁵⁸.

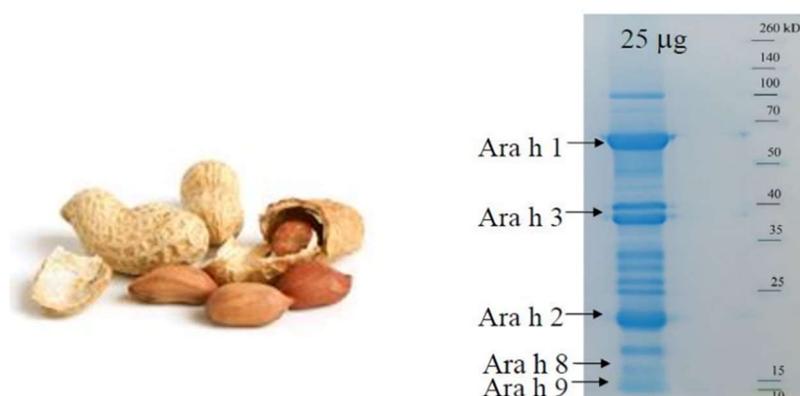


Figure 5.2 : Electrophorèse d'un extrait d'arachide mettant en évidence la présence des allergènes : *Ara h 1*, *Ara h 2*, *Ara h 3*, *Ara h 8* et *Ara h 9*.

5.1.1.2 Etape 2 : Western Blot

Cette technique permet de mettre en évidence la présence et la fonction de reconnaissance des anticorps primaires spécifiques IgE sur les allergènes de manière qualitative. Les protéines de l'extrait d'arachide sont séparées par la technique SDS-PAGE (figure 5.3a) comme décrit dans la section 5.1.1, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Ces membranes sont incubées avec du sérum de patient pour permettre aux anticorps spécifiques IgE de se fixer sur les allergènes (figure 5.3b). Après lavage, une solution d'anticorps secondaires marqués à un enzyme est ajoutée pour révéler les anticorps spécifiques IgE par chimiluminescence CLIA (figure 5.3c). La séparation spatiale des allergènes sur la membrane de nitrocellulose permet l'identification individuelle des anticorps spécifiques IgE.

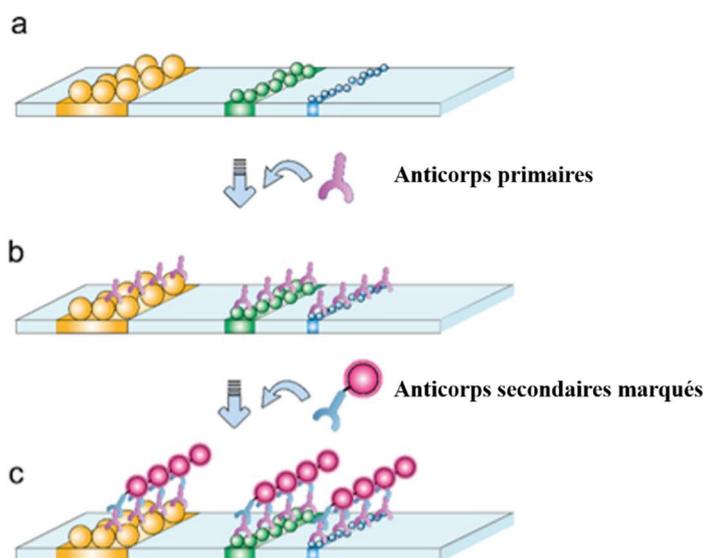


Figure 5.3 : Schéma de principe de la technique « Western Blot ».

La figure 5.4 montre les tests Western Blot effectués par le laboratoire de Toulouse avec des sérums de forte, moyenne et faible concentration en anticorps IgE dirigés vers l'extrait d'arachide. Les concentrations sont indiquées sur la figure : 95.8 UI/ml, 15.7 UI/ml et 0.1 UI/ml avec 1 UI/ml = 2.4 ng/ml. La colonne de gauche est constituée de repères permettant d'identifier la masse moléculaire des protéines en kDa. La révélation effectuée par chimiluminescence indique un signal positif par la présence d'une tache noire. On remarque un signal important pour les sérums forts, une intensité faible pour les sérums intermédiaires et un signal nul pour les sérums faibles. De plus, une intensité importante aux emplacements des allergènes majeurs de l'arachide est observée. Cela confirme la réaction des anticorps du sérum avec les allergènes de l'arachide mise en évidence par le test SDS – PAGE (section 5.1.1).

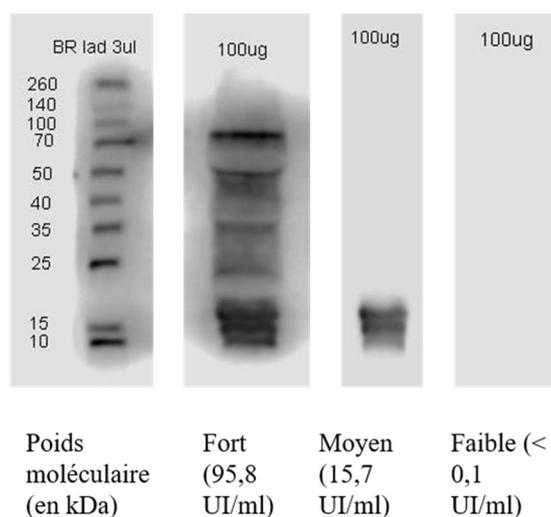


Figure 5.4 : Analyse qualitative des 3 sérums de patient sensible à l'arachide de concentrations d'IgE différentes par la méthode Western Blot.

5.1.2 Analyse quantitative des sérums de patient par technologie ImmunoCAP®

Les sérums de patient que nous analyserons par la technologie microbilles, ont été préalablement analysés par le laboratoire d'analyses médicales des hospices civils de Lyon, partenaire dans ce projet de recherche. Des mesures de concentration des anticorps IgE spécifiques ont été effectuées par la méthode ImmunoCAP® (quantitative) au centre hospitalier de Lyon sud.

Cette méthode décrite dans la section 1.2.3.1, permet d'évaluer la concentration des anticorps spécifiques IgE contenus à l'intérieur des sérums de patient. Le tableau 5.2 liste les concentrations en anticorps IgE pour plusieurs sérums regroupés en 3 catégories : les sérums sensibles à l'arachide, la noisette et la crevette. Les résultats indiquent la concentration des anticorps spécifiques dirigés contre les extraits totaux d'arachide, de noisette et de crevette exprimée en UI/ml. Par la suite, nous analyserons les 5 sérums de patient sensibilisé à l'arachide présentant des concentrations en IgE spécifiques différentes (Arachide 1-5), le sérum fortement sensibilisé à la noisette (Noisette 1) et le sérum fortement sensibilisé à la crevette (Crevette 1).

Sérums de patient Arachide	Concentration en IgE spécifique en UI/ml (extrait d'arachide)
Arachide 1	> 100
Arachide 2	> 100
Arachide 3	95.8
Arachide 4	15.7
Arachide 5	< 0.1
Sérums de patient Noisette	Concentration en IgE spécifique en UI/ml (extrait de noisette)
Noisette 1	> 100
Sérums de patient Crevette	Concentration en IgE spécifique en UI/ml (extrait de crevette)
Crevette 1	> 100

Tableau 5.2 : Concentrations (exprimées en UI/ml) mesurées avec la technologie ImmunoCAP® des anticorps spécifiques IgE des sérums de patient mis à notre disposition par le laboratoire de Lyon.

Afin de préparer les tests de détection des anticorps IgE nous avons analysé les extraits d'allergènes et les sérums de patient. Premièrement, les extraits d'allergènes ont été analysés par la technique SDS-PAGE afin de s'assurer que les principaux allergènes sont présents dans les extraits. Nous avons réalisé les tests avec l'extrait d'arachide et mis en évidence la présence des allergènes de l'extrait d'arachide, de noisette et de crevette. Les sérums de patient sensible à l'arachide ont été analysés par la méthode Western Blot qui a permis de révéler la présence des anticorps spécifiques IgE ciblant les allergènes présents dans les extraits d'arachide. Les sérums ont également été analysés avec le système ImmunoCAP® pour quantifier précisément la composition en anticorps spécifiques de chaque sérum, ces mesures constituent notre point de comparaison pour les tests cliniques que nous allons effectuer.

5.2 Détection des anticorps IgE sériques par la méthode microbilles

5.2.1 Description de la méthode

La méthode microbilles est la combinaison des 3 technologies étudiées précédemment : la biofonctionnalisation de surface, le tri magnétique et l'assemblage gravitationnel. Pour chaque test, nous utiliserons des microbilles PS fonctionnalisées avec les allergènes correspondants à la sensibilisation du sérum de patient (arachide, noisette ou crevette) et des microbilles témoins fonctionnalisées à la BSA, cette protéine ne réagit pas avec les sérums de patient testés (figure 5.5a). Le code couleur est le suivant : les microbilles rouges sont fonctionnalisées avec les allergènes et les microbilles bleues sont fonctionnalisées avec la BSA (test témoins). L'efficacité du tri magnétique (pourcentage de microbilles piégées magnétiquement) sera évaluée selon deux méthodes.

La première méthode est basée sur le procédé d'assemblage gravitationnel (figure 5.5c) développé dans le chapitre 4 suivi d'un comptage de microbilles par analyse de photos de l'échantillon prises au microscope optique. La quantité de microbilles rouge et bleu présent à la surface de l'échantillon donnera l'efficacité du tri magnétique pour les deux types de microbilles. Chaque test est effectué trois fois dans les mêmes conditions expérimentales pour produire une moyenne et un écart type.

La deuxième méthode utilisée (figure 5.5d) est basée sur la mesure d'absorbance des microbilles en suspension réalisée dans le même temps que le tri magnétique. Cette méthode permet d'évaluer plus rapidement la concentration des microbilles de l'échantillon après le procédé de tri magnétique. À savoir, que le test avec les microbilles témoins doit être réalisé séparément des microbilles allergènes, car cette méthode ne permet pas de discriminer le code couleur inhérent aux microbilles.

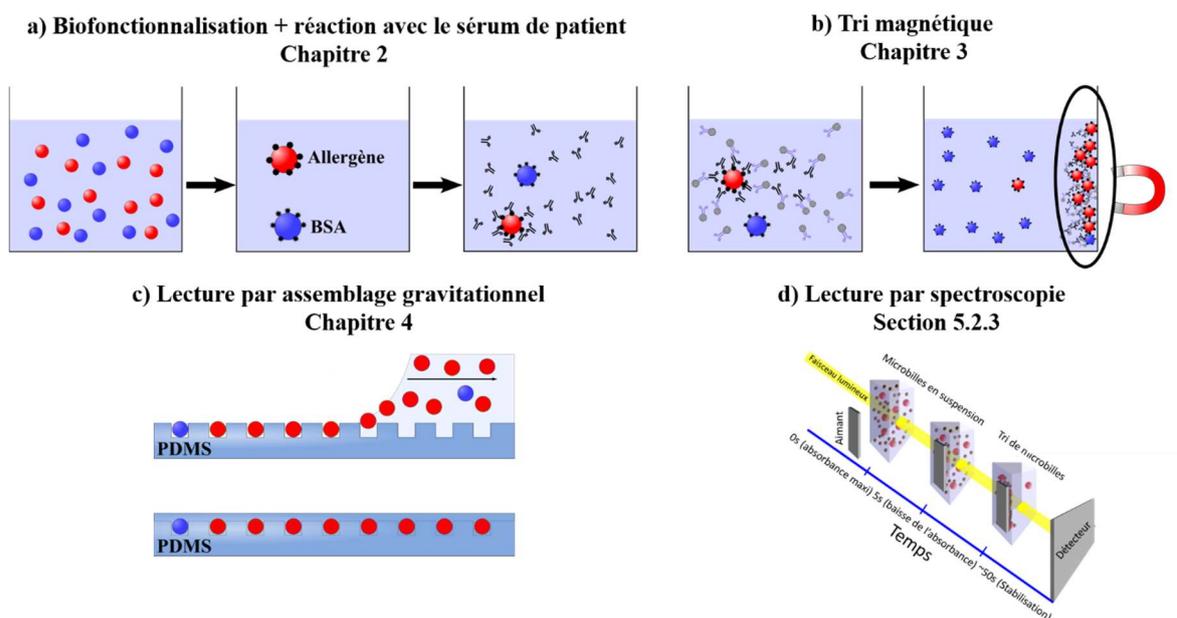


Figure 5.5 : Schéma du principe de la méthode de détection des IgE par technologie microbilles. **a)** étape de biofonctionnalisation suivi de la réaction avec le sérum de patient, **b)** étape de tri magnétique, lecture des résultats par **c)** assemblage gravitationnel ou **d)** par spectroscopie.

Premièrement, 10^5 microbilles PS enrobées d'allergènes sont mises en suspension dans une solution tampon de réaction (TBN 0.1 %) et incubées avec un volume de 50 μ l de sérum de patient pendant 2 h à température ambiante. Les microbilles sont lavées par centrifugation pour retirer l'excès d'IgE libres et les protéines indésirables susceptibles de subir des interactions non-spécifiques. Puis une suspension contenant 10^7 microbilles SPM MyOne (1 μ m) est ajoutée à l'échantillon dans un volume de 500 μ l de solution tampon TBN à 0.1 %. L'échantillon est incubé sous agitation mécanique pendant 30 minutes à température ambiante. Le microtube « A » contenant le mélange est placé en contact avec un aimant permanent pendant 2 minutes. Le surnageant est retiré et disposé dans un autre microtube noté « B » alors que les microbilles piégées magnétiquement sont remises en suspension dans le microtube « A » dans un volume égale à celui du microtube B. L'assemblage gravitationnel ou les mesures d'absorbance sont alors effectués pour évaluer l'efficacité du tri magnétique.

5.2.2 Lecture des résultats par assemblage gravitationnel

5.2.2.1 Sérum sensibles à l'arachide de 0.1 UI/ml à 100 UI/ml

Dans un premier temps, nous avons analysé des échantillons de sérum de patient allergique à l'arachide présentant les concentrations en IgE spécifiques suivant : 0.1 UI/ml, 1 UI/ml, 10 UI/ml et 100 UI/ml. Cela correspond à la gamme de concentration détectable par les méthodes automatisées actuelle (HYCOR, Immulite ou ImmunoCAP). Nous avons utilisé le sérum : Arachide 1 (100 UI/ml) et effectué plusieurs dilutions pour obtenir les échantillons avec ces concentrations. L'objectif est d'étudier l'influence de la concentration d'anticorps IgE du sérum de patient sur l'efficacité du tri magnétique. Les microbilles PS fonctionnalisées avec l'extrait

d'arachide et les microbilles PS fonctionnalisées avec la protéine BSA (Bovine Serum Albumine) ne réagissant pas avec le sérum de patient dans le but de constituer un signal témoin ont été utilisés. Le comptage de microbilles a été effectué à l'aide de la méthode d'assemblage gravitationnel suivi d'une analyse d'image microscope où 10 % de la surface de l'échantillon est analysée grâce au logiciel d'analyse d'image « ImageJ ». Chaque dilution de sérum a été analysée trois fois et les résultats sont indiqués sur l'histogramme de la figure 5.6. La quantité de microbilles alors mesurée est rapportée à la quantité initiale utilisée pour une condition (10^5 microbilles), le ratio entre ces deux valeurs nous donne un pourcentage représentant l'efficacité du tri magnétique.

Sur l'histogramme, les colonnes noires représentent le pourcentage de microbilles arachide piégées magnétiquement et les colonnes rouges représentent le pourcentage de microbilles témoins piégés magnétiquement en fonction de la concentration en IgE spécifiques du sérum de patient analysé. On remarque une augmentation de l'efficacité du tri magnétique avec la concentration en IgE (5 % à 38 %) des microbilles arachide alors que le pourcentage des microbilles témoins est constant (5 %). La figure montre une nette différence entre les microbilles arachide (38 %) et les microbilles témoins (7 %) pour la concentration la plus forte (100 UI/ml). Pour les concentrations intermédiaires (1 UI/ml et 10 UI/ml) le signal positif est légèrement supérieur au signal témoin (8 % et 12 %). En ce qui concerne la concentration la plus faible (0.1 UI/ml) les valeurs du signal arachide et BSA est identique. Cette tendance atteste que l'efficacité du tri magnétique est plus importante pour le sérum de patient à forte concentration en IgE spécifique avec une valeur bien supérieure à celle du signal témoin. Ce résultat montre qu'il est possible de mettre en évidence une concentration anormale d'IgE spécifiques (> 1 UI/ml) par la technologie microbilles.

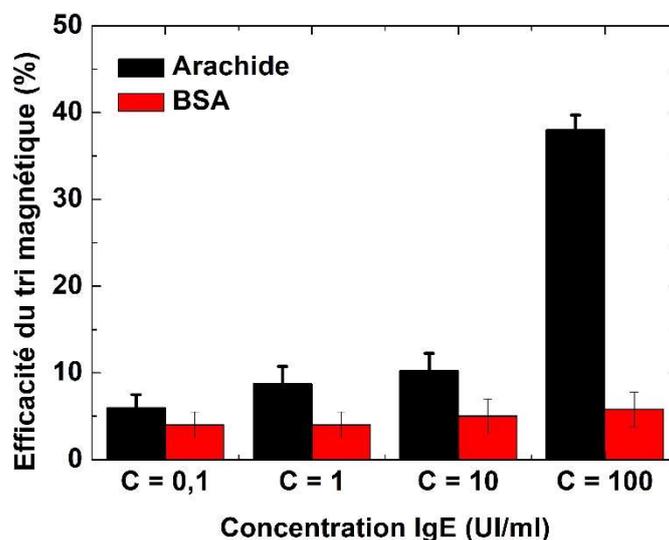


Figure 5.6 : Calibration montrant l'efficacité du tri magnétique en fonction de la concentration IgE (rouge) et le signal témoin (en noir).

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les tests sur 4 sérums de patients (Arachide 2 – 5) de concentration en IgE différentes (valeurs ImmunoCAP® : 0.1 UI/ml, 15.7 UI/ml, 95.8 UI/ml et 100 UI/ml) fournis par notre laboratoire partenaire situé au centre hospitalier de Lyon sud. Chaque test a été réalisé 3 fois. Les résultats sont reportés sur l'histogramme de la figure 5.7

qui présente l'efficacité du tri magnétique des microbilles Arachide et BSA en fonction des différents sérums analysés. Les résultats révèlent une augmentation de l'efficacité du tri magnétique avec la concentration d'IgE. L'efficacité est très élevée 44.7 %, 44.4 % et 35.2 % pour les sérums : Arachide 2 (100 UI/ml), Arachide 3 (95.8 UI/ml) et Arachide 4 (15.7 UI/ml). La variation de signal avec les microbilles témoins (< 6 %) est significative. Le sérum de patient Arachide 5 de concentration 0.1 UI/ml ne présente pas de variation significative avec les microbilles BSA (6 % contre 4 %). Pour chaque test, il a été possible de discriminer les sérums non sensibilisés (Arachide 5) des sérums sensibilisés (Arachide 2, 3 et 4) à l'arachide.

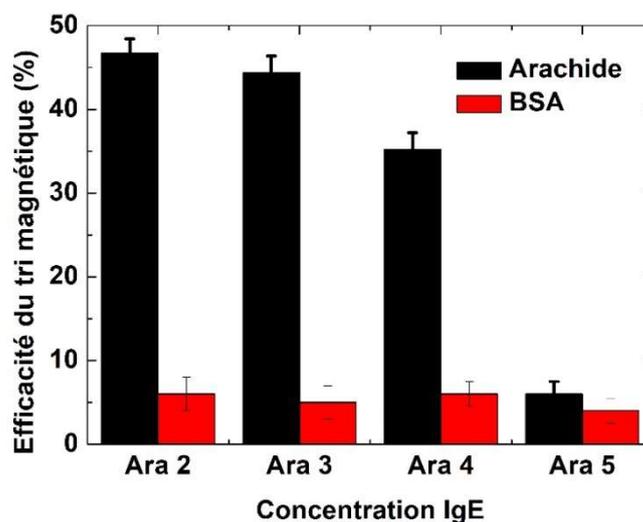


Figure 5.7 : Analyse des sérums de patient par technologie microbilles.

Les résultats présentés sur les deux diagrammes précédents ont été résumés sur la figure 5.8. Nous avons effectué les analyses sur 5 sérums de patient différents. Les points rouges représentent les tests témoins et les points noirs représentent les tests avec les microbilles arachide. Les moyennes sont représentées par les points expérimentaux alors que les barres d'erreurs représentent l'écart type de la mesure calculé à partir des trois analyses effectuées sur chaque condition. On remarque que l'efficacité du tri magnétique augmente globalement avec la concentration en IgE spécifique. Lorsque la concentration est très faible (< 0.1 UI/ml), l'efficacité est semblable à celle des tests témoins (~5 %). Dans le cas des concentrations plus élevées (entre 1 UI/ml et 10 UI/ml), l'efficacité est légèrement supérieure aux tests témoins (entre 8 % et 10 %) et pour des concentrations élevées (> 10 UI/ml) l'efficacité est significativement supérieure au tests témoins (> 35 %).

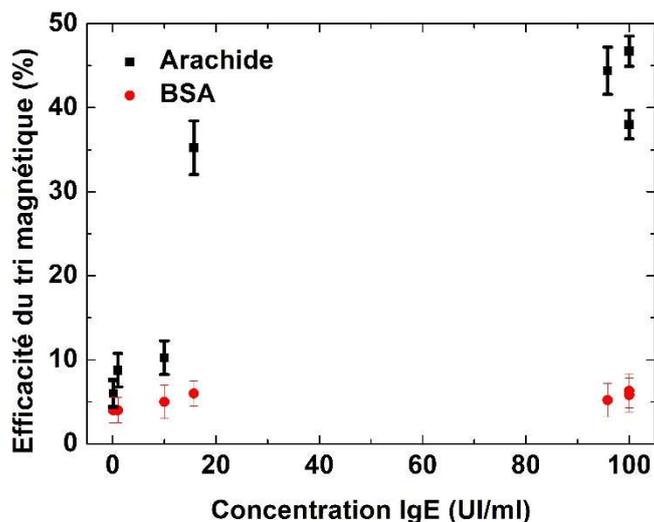


Figure 5.8 : Analyse qualitative sur 5 sérums de patients sensibles à l'extrait d'arachide présentant 4 concentrations en IgE différentes.

5.2.2.2 Sérum fortement sensibles (> 100 UI/ml) aux extraits d'arachide, de noisette ou de crevette

Dans cette section, nous présentons les résultats des tests de détection des anticorps IgE sur les sérums de patient possédant une forte concentration d'IgE (> 100 UI/ml). Les tests avec des sérums fortement sensibilisés individuellement à l'arachide, à la noisette ou à la crevette ont été effectués suivant le protocole explicité dans la section 5.2.1.

Les résultats sont indiqués sous la forme d'un histogramme (figure 5.9), chaque sérum est identifié par l'extrait d'allergène auquel il est sensible (arachide, noisette ou crevette). Le pourcentage en ordonnée correspond à l'efficacité du tri magnétique. Le signal allergène correspond à l'efficacité du tri magnétique sur les microbilles PS fonctionnalisées avec les allergènes auxquels le sérum de patient est sensible (arachide, noisette ou crevette). Le signal témoin présenté (colonnes rouges) est l'efficacité du tri magnétique réalisé sur les sérums avec des microbilles BSA. On remarque que le sérum sensibilisé à l'arachide obtient le meilleur résultat avec 35 % d'efficacité, le sérum de noisette 15 %, le sérum de crevette 8 % pour un signal témoin compris entre 4 % et 6 %. La différence de signal avec le test témoin est significative pour les sérums sensibilisés à l'arachide et à la noisette. Cependant, dans le cas de l'allergie à la crevette, la différence avec le test témoin n'est que de 2 %. Cependant, cette différence est suffisamment élevée pour conclure à la détection d'anticorps IgE spécifiques. Effectivement, la valeur maximale atteinte par les tests témoins est de 6 % et la valeur avec l'extrait d'allergène à la crevette est de 8 %.

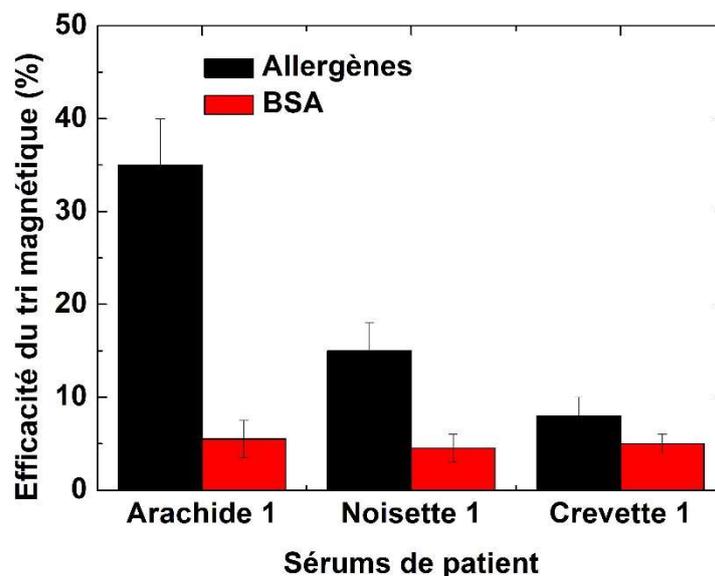


Figure 5.9 : Résultats des analyses sur les sérums de patient sensible à l’arachide, la noisette et la crevette par rapport au signal témoin.

5.2.3 Lecture rapide des résultats par spectroscopie

Nous avons également réalisé des mesures d’absorbance évaluant l’efficacité du tri magnétique pour un temps de procédé plus rapide qu’avec la technologie d’assemblage gravitationnel. La mesure effectuée par absorbance est immédiate et est réalisée simultanément au tri magnétique. Comme l’indique le schéma de la figure 5.10 le tri magnétique est effectué *in-situ* dans une cuve traversée par un faisceau lumineux à l’intérieur d’un spectromètre. Un aimant permanent plan est mis en contact avec la paroi de la cuvette pendant une minute. Par conséquent, la totalité des microbilles SPM et des microbilles PS positives (recouvertes d’IgE) migrent vers la paroi en sortant du chemin optique. Ainsi, l’absorbance mesurée diminue rapidement et atteint une valeur limite au moment où toutes les microbilles SPM et PS positives ont migré vers la paroi. Cette valeur d’absorbance est proportionnelle à la concentration de microbilles PS contenues dans la cuvette d’absorbance. Par conséquent, cette mesure permet d’évaluer la concentration de microbilles PS non piégées magnétiquement ainsi que l’efficacité du tri magnétique. Ce procédé de lecture est plus rapide (2 min) comparé à la technique d’assemblage gravitationnel (15 minutes). De plus, la lecture se fait simultanément avec le tri magnétique alors que l’assemblage gravitationnel demande deux étapes de plus (assemblage et comptage par microscope optique).

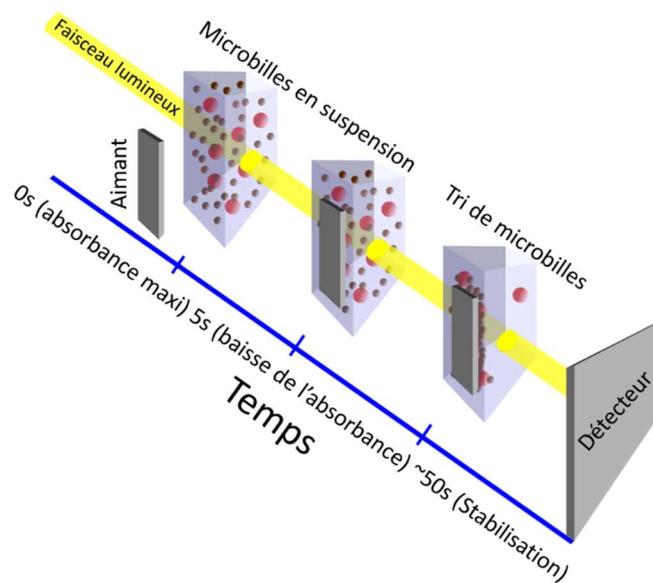


Figure 5.10 : Schéma : méthode d'analyse de l'efficacité du tri magnétique par mesure d'absorbance en direct.

Afin de montrer la faisabilité de cette technique, deux sérums de patient ont été testés sur des microbilles fonctionnalisées arachide : un fortement sensibilisé à l'arachide (100 UI/ml) et un sérum non sensibilisé ($< 0,1$ UI/ml). Le graphique de la figure 5.11 montre l'évolution de l'absorbance normalisée durant le procédé de tri magnétique des 2 sérums de patient. L'absorbance est normalisée par rapport à l'absorbance initiale (microbilles PS et SPM). Après le tri magnétique, la différence d'absorbance entre le sérum fortement sensibilisé et celui non sensibilisé est significative (0,5 pour le sérum à 0,1 UI/ml, 0,2 pour le sérum à 100 UI/ml). Dans les 2 cas, toutes les microbilles SPM ont migré vers la paroi ; la différence d'absorbance entre les 2 sérums est uniquement due à une différence de concentration de microbilles PS après le tri magnétique. En effet, la totalité des microbilles PS sont restées en suspension et génèrent une absorbance plus importante pour le sérum à 0,1 UI/ml comparée au test avec le sérum fort (100 UI/ml) où une proportion non-négligeable de microbilles PS ont migré vers la paroi aux contacts des microbilles SPM créant une différence d'absorbance nettement observable. Cette différence d'absorbance permet de mettre en évidence rapidement la présence des anticorps IgE dirigés vers les extraits d'arachide.

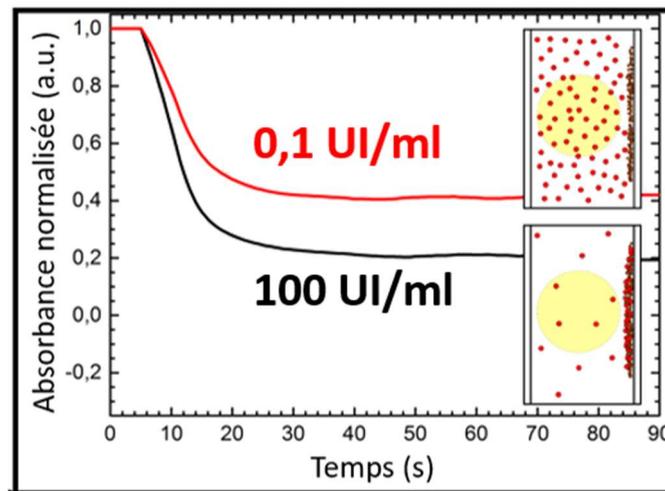


Figure 5.11 : Variation de l'absorbance entre le sérum fortement sensible (en noir) et le sérum faiblement sensible (en rouge).

Dans cette partie, nous avons rappelé le protocole détaillé de détection d'IgE en indiquant la nature des réactifs, des solutions tampon et des temps de réaction. À chaque test 10^5 microbilles sont utilisées par condition pour un temps de procédé de 3 h. Les avantages et inconvénients de cette technique ont été comparés par rapport aux tests conventionnels actuellement utilisés. La calibration du système est effectuée avec des microbilles recouvertes d'arachide d'une part et des microbilles fonctionnalisées BSA qui constituent le test témoin d'autre part. L'efficacité du tri magnétique est mesurée grâce à des moyens optiques. Nous avons montré que le signal témoin est constant alors que le signal arachide dépend de la concentration des anticorps IgE. Des tests sur 3 sérums de patient fortement allergiques indépendamment à 3 extraits d'allergènes ont été réalisés : arachide, noisette et crevette. Dans chaque cas, le signal mesuré est supérieur au signal témoin montrant la détection d'une concentration anormale d'anticorps IgE. Nous avons également effectué des tests sur 4 sérums de patient avec des concentrations en IgE variables. Cette méthode a permis de mettre en évidence les sérums la concentration trop élevée de certains sérums de patient. De plus, l'analyse du tri magnétique a permis de déterminer si le sérum est sensible à l'extrait d'allergènes en concordance avec les analyses ImmunoCAP®. Cependant, nous avons mis en évidence que les résultats avec les tests ImmunoCAP® sont très différents en valeur absolue.

5.3 Conclusion

Le tableau 5.3 résume les performances de la technologie microbilles comparées aux performances de la technologie ImmunoCAP® et à celles de l'état de l'art. La limite de détection atteinte par la méthode microbilles a été estimée à 1 UI/ml (2.4 ng/ml). Les tests présentés dans ce chapitre ont été réalisés en 3 h : 2 h d'incubation avec le sérum, 30 minutes d'incubation avec les microbilles SPM et 30 minutes d'assemblage et d'analyse. Il a été mis en évidence que la concentration en IgE spécifique du sérum de patient a une influence sur l'efficacité du tri magnétique. Il a été possible de détecter des anticorps IgE dirigés vers l'extrait d'arachide pour les sérums de patient comprenant une concentration d'anticorps IgE supérieure ou égale à 1 UI/ml. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'anticorps IgE dans les sérums de patient allergiques à l'arachide, la noisette et la crevette. Une technique rapide de comptage de microbilles PS par absorbance de la suspension rendant la lecture des résultats rapide et efficace a été mise au point.

Méthode	Temps de réaction	Volume de sérum	Limite de détection
Etat de l'art	12 min – 3 h	1 µl – 50 µl	0,084 ng/ml – 17,5 ng/ml
ImmunoCAP®	3 h	40 µl	0,24 ng/ml
DIALMIB	3 h	50 µl	2,4 ng/ml

Tableau 5.3 : Récapitulatif des performances de technologies de diagnostic d'allergies.

Ce procédé présente des avantages par rapport aux techniques conventionnelles, car les microbilles PS et SPM ont une diffusion importante ce qui diminue le temps de réaction avec le sérum par rapport à des techniques où la réaction a lieu à la surface d'une phase solide immobile. Elle est également plus flexible, car il est possible de tester une grande variété d'allergènes différents grâce au procédé de biofonctionnalisation de surface qui reste identique quelle que soit la nature de la protéine à greffer. Cette flexibilité est une avancée majeure pour apporter un outil de diagnostic adapté au patient (de type Point-Of-Care) à la différence des techniques d'analyses conventionnelles où les allergènes et sources allergéniques sont imposées par les fabricants et ne permettent pas de s'adapter réellement au besoin du patient et de faire preuve de réactivité. De plus, le test ImmunoCAP® est capable de réaliser des tests sur un allergène à la fois alors que la méthode microbilles proposée ouvre la voie vers le diagnostic multiplexe des allergies grâce à l'encodage couleur des microbilles. En effet, avec cette technique, il est potentiellement réalisable de tester 100 allergènes en une seule fois. Nous avons montré dans le chapitre 3, qu'une quantité de 10^4 microbilles suffit pour effectuer une analyse sur une condition, de plus l'assemblage gravitationnel a une capacité d'assemblage de 10^6 microbilles, ce qui démontre la possibilité d'un multiplexage de 100 avec cette technologie. Cependant, cette condition nécessite l'utilisation de microbilles de 100 couleurs différentes avec une méthode optique permettant leur discrimination selon leur couleur. La quantité d'allergène et d'anticorps secondaires nécessaire par test est faible ce qui diminuerait les coûts d'un test de dépistage d'allergies.

Dans ce chapitre, les résultats des analyses conduites sur 7 sérums de patient différents ont été effectués 3 fois pour pouvoir en déduire une moyenne statistique et un écart type correspondant à chaque mesure. Nous avons démontré que cette méthode permet la détection d'une concentration d'anticorps IgE supérieure à 10ng/ml.

Tout d'abord, nous avons démontré par analyse SDS-PAGE que les extraits d'allergènes utilisés sont composés des allergènes majeurs *Ara h 1*, *Ara h 2* et *Ara h 3*. De plus, les analyses ImmunoCAP® et Western Blot ont montré que les sérums de patient réagissent positivement aux allergènes des extraits immobilisés à la surface des microbilles PS.

Puis nous avons décrit l'approche méthodologique utilisée lors de la réalisation des tests. Des analyses ont été réalisées sur des sérums de patient fortement sensibilisés à l'arachide, la noisette, la crevette par l'utilisation de la technologie microbilles. Les résultats ont montré une efficacité de tri magnétique supérieur au test témoin caractéristique d'une concentration d'anticorps IgE spécifiques supérieure à la normale. Finalement, des tests ont été effectués sur des sérums sensibilisés à l'arachide présentant des concentrations variables (entre 0.1 UI/ml et 100 UI/ml). Les résultats des tests ont confirmé la capacité de la méthode à mettre en évidence une concentration anormalement élevée d'anticorps IgE dirigés contre les extraits totaux d'arachide.

Dans la dernière partie, nous avons comparé les performances de cette technique avec la méthode ImmunoCAP® en termes de limite de détection (1 UI/ml), reproductibilité (< 10 %), temps de réaction (3 h) et volume de sérum nécessaire (50 µl).

Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse consistait à apporter la preuve de concept de détection des anticorps IgE par l'analyse des échantillons de sérum de patient grâce à la technologie microbilles composée des étapes technologiques suivantes : biofonctionnalisation de microbilles, tri magnétique et assemblage gravitationnel.

Tout d'abord, nous avons présenté dans ce manuscrit les concepts fondamentaux sur le fonctionnement des allergies. Les différents outils de diagnostics actuellement utilisés dans le domaine des allergies ont été répertoriés et un bilan des techniques émergentes en recherche s'appuyant sur l'utilisation des nano et microparticules a été dressé. La méthode choisie et développée au cours de cette thèse a été présentée brièvement ainsi que ses avantages par rapport aux autres techniques de l'état de l'art.

Le procédé de greffage de protéines à la surface des microbilles a été présenté. D'une part la fixation d'allergènes sur des microbilles PS 10 μm carboxyles et d'autre part la fixation d'anticorps secondaires anti-IgE ou anti-IgE à la surface des microbilles SPM 1 μm . Des méthodes de caractérisation de fonctionnalisation ont été menées pour contrôler la qualité et la réussite des différents protocoles de biofonctionnalisation utilisés.

La technologie du tri magnétique de microbilles par magnétophorèse a été étudiée et caractérisée. Nous nous sommes inspirés du tri magnétique cellulaire pour établir un protocole adapté et dédié aux microbilles PS de diamètre 10 μm . Puis, l'influence de certains paramètres sur l'efficacité du tri magnétique a été étudiée. L'influence de la quantité de microbilles PS et SPM et le temps de réaction (entre les microbilles PS et le sérum) sur l'efficacité du tri magnétique a également été investigué. Cette étude a révélé qu'une diminution de la quantité de microbilles PS augmente l'efficacité du tri magnétique. L'efficacité diminue avec le temps de réaction entre les microbilles PS et le sérum de patient. Il a été montré que l'efficacité est supérieure à 80 % à partir de 20 minutes de réaction pour une concentration élevée d'anticorps primaires. La courbe décrivant l'évolution de l'efficacité du tri magnétique en fonction de la concentration en anticorps primaire a été tracée. Nous avons mis en évidence une zone de corrélation linéaire où il est possible de réaliser des mesures quantitatives afin de relier l'efficacité du tri magnétique et la concentration en anticorps IgE du sérum de patient.

En parallèle, une étude bibliographique sur les techniques d'assemblage de particules uniques sur une surface a été conduite pour comprendre les différents outils à notre disposition pour le positionnement de structures discrètes de particules sur une surface. Le développement de la technique d'assemblage de microbilles uniques a prouvé que les microbilles PS 10 μm subissent la gravité de manière non-négligeable et possèdent une sédimentation rapide même s'ils sont considérés théoriquement comme des colloïdes. Une méthode d'assemblage dit « gravitationnel » a été élaborée en 4 étapes : dissolution des bulles d'air, sédimentation, piégeage convectif et balayage capillaire. Toutes ces étapes technologiques ont été caractérisées en termes de temps de procédé et de performances. Il a été prouvé qu'il est possible de réaliser des assemblages très rapides (10 min) avec un taux de défauts inférieur à 5 % et des assemblages présentant un taux de défauts très faible (< 0.0001 %). Cette technologie a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Finalement, nous avons exploité les trois technologies développées au cours de ces travaux de thèse (biofonctionnalisation, tri magnétique et assemblage gravitationnel) pour évaluer des sérums de patient individuellement allergiques à l'arachide, à la noisette et à la crevette. Tout d'abord, les extraits d'allergènes et les sérums de patient ont été examinés pour vérifier que les allergènes et les anticorps spécifiques sont réactifs entre eux. L'analyse d'un sérum de patient à 4 dilutions différentes : 0.1 UI/ml, 1 UI/ml, 10 UI/ml et 100 UI/ml a montré la corrélation entre l'efficacité du tri magnétique et la concentration en anticorps IgE spécifiques contenus dans le sérum. Nous avons également testé 5 sérums de patient différents contenant des IgE spécifiques de concentrations variées et évalué l'écart par rapport aux résultats ImmunoCAP®. Puis, des sérums de patient fortement allergiques à l'arachide à la noisette et à la crevette ont été testés. Les résultats obtenus indiquent que cette méthode permet la détection des anticorps spécifiques au-dessus d'une certaine concentration (> 1 UI/ml) mais ne permet pas d'effectuer une mesure quantitative précise.

Perspective 1 : Diminution du diamètre des microbilles PS

La limite de détection dépend de nombreux paramètres comme la taille et le taux de fonctionnalisation des microbilles PS et SPM. En particulier, il a été montré qu'une diminution du diamètre des microbilles PS et/ou SPM augmente l'efficacité du tri magnétique et par conséquent la limite de détection des anticorps IgE. Nous avons montré que l'utilisation de microbilles PS 6 μm présente une limite de détection de deux ordres de grandeur inférieurs aux microbilles PS 10 μm . Ce résultat a été obtenu en analysant le sérum de lapin contenant des anticorps primaires IgG dirigés vers l'extrait d'arachide. Cependant, les analyses effectuées sur le sérum de patient ont été réalisées avec des microbilles de diamètre 10 μm . Par extrapolation, il est possible que la limite de détection des anticorps spécifiques IgE du sérum de patient puisse être également diminuée de deux ordres de grandeur. Ainsi, la limite de détection des tests commerciaux actuellement utilisés dans le cadre du diagnostic d'allergies pourrait être atteinte (0.1 UI/ml au lieu de 10 UI/ml).

Nous avons démontré en réalisant des tests avec le sérum de lapin qu'il est possible de réaliser ces tests sur un temps plus court (réaction avec le sérum de 20 min au lieu de 2 h) sans changer significativement la sensibilité (baisse de 5 % de l'efficacité du tri magnétique). Ainsi, les tests pourraient être effectués en 1 h (durée globale), soit trois fois plus rapidement que les analyses de sérum de patient présentées lors de ces travaux de thèse.

Nous avons choisi de réaliser les analyses avec un volume de sérum de patient de 50 μl , car c'est une valeur proche du volume de 40 μl par allergène requis par le protocole établi par ImmunoCAP®. De plus, les techniques de l'état de l'art basé sur l'utilisation de micro-nano particules utilisent un volume compris entre 1 μl et 50 μl de sérum de patient. Un autre axe de recherche serait de diminuer le volume de sérum utilisé pour étudier son impact sur la limite de détection.

Perspective 2 : intégration d'un dispositif lens-less

Parallèlement à mes travaux de recherche au cours de cette thèse, des études ont été menées au sein du laboratoire sur un dispositif lens-less destiné au comptage de microbilles (figure A).

C'est un dispositif créé à partir d'un capteur CMOS. Le dispositif est dit « lens-less », car il n'y a pas de lentilles. L'échantillon micro structuré contenant les microbilles assemblées est placé sur le capteur CMOS qui prend une image holographique qui est reconstitué après application d'algorithmes de reconstruction d'images. Une approche innovante serait de réaliser l'assemblage gravitationnel directement au sein de ce dispositif lens-less sur le capteur CMOS. L'intérêt de cette perspective est la possibilité de regrouper les étapes d'assemblage gravitationnel et de comptage constituant un gain de temps sur le temps de procédé global.

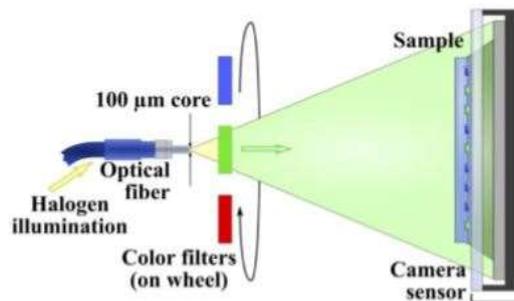


Figure A : Schéma du dispositif optique lens-less.

Perspective 3 : Test avec des allergènes moléculaires

Les résultats des analyses montrent qu'il n'est pas possible de déterminer avec précision la concentration absolue des anticorps IgE à cause de la fluctuation des résultats entre les différents sérums de patient analysés. Une des explications avancées est la différence de sensibilité du test en fonction des anticorps spécifiques contenus dans le sérum dont les concentrations et ratio varie en fonction du profil allergique du patient. Ainsi, des sérums de patients peuvent présenter une concentration en anticorps IgE dirigés vers l'extrait d'allergènes semblable tout en produisant des efficacités de tri magnétiques très différentes dû aux concentrations en IgE spécifiques différentes. Par conséquent, il est nécessaire de réaliser des tests avec des allergènes moléculaires au lieu de l'extrait d'allergènes total qui est constitué de plusieurs protéines allergéniques afin de rendre le test plus précis avec une meilleure reproductibilité.

Par exemple, l'extrait d'arachide contient 16 allergènes différents dont les allergènes majeurs : *Ara h 1*, *Ara h 2*, *Ara h 3*, voir figure B. Pour dresser un profil d'allergies précis du patient il est nécessaire d'effectuer des tests sur les allergènes moléculaires, comme cela est réalisé avec ImmunoCAP® avec 5 allergènes moléculaire. Ainsi, les allergènes auxquels est sensible le patient seront connus. Ce profil donnera une indication sur les habitudes alimentaires que le patient doit adopter pour éviter une réaction allergique. Par ailleurs, l'extrait d'allergène immobilisé sur les microbilles PS est différents de celui utilisé par la technologie ImmunoCAP®. Par conséquent, il est difficile d'effectuer une comparaison entre les 2 technologies : ImmunoCAP® et microbilles.

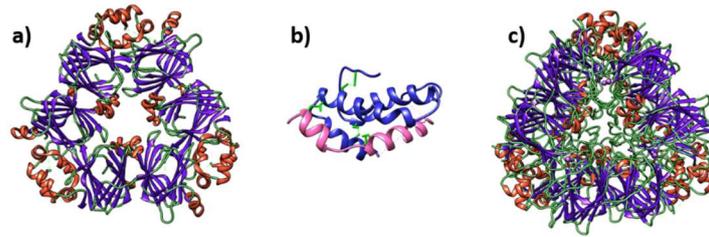


Figure B : Allergènes majeurs de l’arachide a) *Ara h 1*, b) *Ara h 2* et c) *Ara h 3*.

Perspective 4 : Automatisation en puce microfluidique

Comme nous l’avons vu dans la partie 1.3 sur l’état de l’art des outils de diagnostic d’allergies et l’utilisation de nano-microparticules, ces méthodes sont souvent couplées avec la technologie microfluidique pour miniaturiser le dispositif sous la forme d’une puce. De cette manière, les distances de diffusion sont plus courtes diminuant les volumes de sérum et de réactifs utilisés. Par conséquent, ces microdispositifs diminuent le temps de réaction et la limite de détection. Des études pourraient être menées pour étudier le design idéal d’une biopuce où la réaction avec le sérum et les microbilles SPM, le tri magnétique, l’assemblage gravitationnel et le comptage aurait lieu afin de rendre automatique le protocole expérimental tout en diminuant la limite de détection atteinte par la technologie microbilles. La biopuce pourrait être intégrée au sein d’un dispositif miniaturisé global de type Point-Of-Care comme imaginé sur la figure C.



Figure C : Prototype de dépistage d’allergies imaginé, miniaturisé et dessiné sur un logiciel de dessin 3D.

Bibliographie

- ¹ O.C. Herbert, R.S. Barnetson, W. Weninger, U. Krämer, H. Behrendt, and J. Ring, *World Allergy Organ. J.* **2**, 130 (2009).
- ² J. Paupe, E. Paty, J. De Blic, and P. Scheinmann, *Rev. Fr. d'Allergologie d'Immunologie Clin.* **41**, 424 (2001).
- ³ I. Sélo, M. Yvon, and J. Wal, *20* (1998).
- ⁴ W.K. Liew, E. Williamson, and M.L.K. Tang, *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 434 (2009).
- ⁵ <http://www.allergome.org/script/statistic.php>
- ⁶ S.J. Galli, M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *Nature* **454**, 445 (2008).
- ⁷ E. Scala, C. Alessandri, M.L. Bernardi, R. Ferrara, P. Palazzo, D. Pomponi, D. Quaratino, C. Rasi, A. Zaffiro, D. Zennaro, and A. Mari, *Clin. Exp. Allergy* **40**, 911 (2010).
- ⁸ R.G. Hamilton, D.W. MacGlashan, and S.S. Saini, *Immunol. Res.* **47**, 273 (2010).
- ⁹ M.S. Perzanowski, E. Ronmark, H.R. James, L. Hedman, A.J. Schuyler, A. Bjerg, B. Lundback, and T.A.E. Platts-Mills, *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1582 (2016).
- ¹⁰ R. Siraganian, *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 639 (2003).
- ¹¹ H.A. Sampson, *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 891 (2001).
- ¹² F.-D. Popescu, *World J. Methodol.* **5**, 31 (2015).
- ¹³ E. Scala, D. Pomponi, and M. Giani, *Expert Rev. Clin. Immunol.* **9**, 1 (2013).
- ¹⁴ K.A.B.M. Peeters, S.J. Koppelman, E. van Hoffen, C.W.H. van der Tas, C.F. den Hartog Jager, A.H. Penninks, S.L. Hefle, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, E.F. Knol, and A.C. Knulst, *Clin. Exp. Allergy* **37**, 108 (2007).
- ¹⁵ E. Novembre, R. Bernardini, G. Bertini, G. Massai, and A. Vierucci, *Allergy* **50**, 511 (1995).
- ¹⁶ E. Vanin, S. Zanconato, E. Baraldi, and L. Marcazzò, *Pediatr. Allergy Immunol.* **13**, 227 (2002).
- ¹⁷ A. Carosso, M. Bugiani, E. Migliore, J.M. Antò, and R. DeMarco, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **142**, 230 (2007).
- ¹⁸ J. Bousquet, P. Chanez, I. Chanal, and F.-B. Michel, *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 1039 (1990).
- ¹⁹ E. Engvall and P. Perlmann, *Immunochemistry* **8**, 871 (1971).
- ²⁰ L. Zhao, L. Sun, and X. Chu, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **28**, 404 (2009).
- ²¹ R.F. Dudley, *Lab. Med.* **21**, 216 (1990).
- ²² M.E. Jolley, C.-H.J. Wang, S.J. Ekenberg, M.S. Zuelke, and D.M. Kelso, *J. Immunol. Methods* **67**, 21 (1984).
- ²³ <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/>.
- ²⁴ Y.G. Jung, H.-J. Cho, G.Y. Park, J.-Y. Min, H.Y. Kim, H.-J. Dhong, S.K. Chung, and S.W. Kim, *Am. J. Rhinol. Allergy* **24**, 226 (2010).
- ²⁵ P.W. Ewan and D. Coote, *Allergy* **45**, 22 (1990).
- ²⁶ G. Melioli, F. Bonifazi, S. Bonini, E. Maggi, M. Mussap, G. Passalacqua, E.R. Rossi, A. Vacca, and G.W. Canonica, *Clin. Biochem.* **44**, 1005 (2011).
- ²⁷ C. Diaz-Vazquez, M.J. Torregrosa-Bertet, I. Carvajal-Urueña, A. Cano-Garcinuño, E. Fos-Escrivà, A. García-Gallego, F. López-Cacho, M.C. Monzón-Fueyo, X.M. Pérez-Porcuna, and M.L. Ridao-Redondo, *Pediatr. Allergy Immunol.* **20**, 601 (2009).
- ²⁸ R. Hamilton, P. Brock Williams, *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 1, 33-38 (2010).
- ²⁹ M. van Hage, P. Schmid-Grendelmeier, C. Skevaki, M. Plebani, W. Canonica, J. Kleine-Tebbe, M. Nystrand, M. Jafari-Mamaghani, and T. Jakob, *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**, 571 (2017).
- ³⁰ H.-X. Chen, J.-M. Busnel, G. Peltre, X.-X. Zhang, and H.H. Girault, *Anal. Chem.* **80**, 9583 (2008).
- ³¹ P.D. Grossman and J.C. Colburn, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. (Elsevier Science, 1992).
- ³² G. Proczek, A.-L. Gassner, J.-M. Busnel, and H.H. Girault, *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 2645 (2012).
- ³³ B. Teste, F. Malloggi, J.-M. Siaugue, A. Varenne, F. Kanoufi, and S. Descroix, *Lab Chip* **11**, 4207 (2011).
- ³⁴ Y.K. Hahn, Z. Jin, J.H. Kang, E. Oh, M. Han, H. Kim, J. Jang, J. Lee, J. Cheon, S.H. Kim, H. Park, and J. Park, *Anal. Chem.* **79**, 2214 (2007).
- ³⁵ T. Ohashi, K. Mawatari, K. Sato, M. Tokeshi, and T. Kitamori, *Lab Chip* **9**, 991 (2009).
- ³⁶ D. Pomponi, M.L. Bernardi, M. Liso, P. Palazzo, L. Tuppo, C. Rafiaiani, M. Santoro, A. Labrada, M.A. Ciardiello, A. Mari, and E. Scala, *PLoS One* **7**, 1 (2012).
- ³⁷ K.D. Barbee, A.P. Hsiao, E.E. Roller, and X. Huang, *Lab Chip* **10**, 3084 (2010).
- ³⁸ E.-M. King, L.D. Vailes, A. Tsay, S.M. Satinover, and M.D. Chapman, *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 1126 (2007).
- ³⁹ M.D. Chapman, S. Wuenschmann, E. King, and A. Pomés, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **15**, 36 (2015).
- ⁴⁰ T. Chinnasamy, L.I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelius, and H.A. Svahn, *Analyst* **139**, 2348 (2014).
- ⁴¹ I. Märki and F. Rebeaud, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **17**, 50 (2017).
- ⁴² F. Meng, G.H.M. Engbers, and J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.* **70A**, 49 (2004).
- ⁴³ C. Mangeney, M. Fertani, S. Bousalem, M. Zhicai, S. Ammar, F. Herbst, P. Beaunier, A. Elaissari, and M.M.

Chehimi, *Langmuir*, **23**, 22, 10940-10949 (2007).

⁴⁴ M. García, J. Orozco, M. Guix, W. Gao, S. Sattayasamitsathit, A. Escarpa, A. Merkoçi, and J. Wang, *Nanoscale* **5**, 1325 (2013).

⁴⁵ D.M. Monti, D. Guarnieri, G. Napolitano, R. Piccoli, P. Netti, S. Fusco, and A. Arciello, *J. Biotechnol.* **193**, 3 (2015).

⁴⁶ R. Nakaoka and T. Tsuchiya, *Mater Trans.* **43**, 3122 (2002).

⁴⁷ M. Ekkapongpisit, A. Giovia, C. Follo, G. Caputo, and C. Isidoro, *Int. J. Nanomedicine* **7**, 4147 (2012).

⁴⁸ X. Ma, J.Q. Lu, R.S. Brock, K.M. Jacobs, P. Yang, and X.H. Hu, *Phys. Med. Biol.* **48**, 4165 (2003).

⁴⁹ S. Möller and S.R. Forrest, *J. Appl. Phys.* **91**, 3324 (2002).

⁵⁰ Z. Grabarek and J. Gergely, *Anal. Biochem.* **185**, 131 (1990).

⁵¹ F. Reymond, C. Vollet, Z. Plichta, and D. Horák, *Biotechnol. Prog.* **29**, 532 (2013).

⁵² J. Yan, D. Horák, J. Lenfeld, M. Hammond, and M. Kamali-Moghaddam, *J. Biotechnol.* **167**, 235 (2013).

⁵³ A. Agrawal, T. Sathe, and S. Nie, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3778 (2007).

⁵⁴ N. Pamme and C. Wilhelm, *Lab Chip* **6**, 974 (2006).

⁵⁵ T. Scheper, A. Kumar, I.Y. Galaev, and B. Mattiasson, *Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methods* (2008).

⁵⁶ J.J. O'Mahony, M. Platt, D. Kilinc, and G. Lee, *Langmuir* **29**, 2546 (2013).

⁵⁷ G. Sircar, D. Sarkar, S.G. Bhattacharya, and S. Saha, *Methods Mol. Biol.* **1184**, 165 (2014).

⁵⁸ S.J. Koppelman, M. Wensing, M. Ertmann, a. C. Knulst, and E.F. Knol, *Clin. Exp. Allergy* **34**, 583 (2004).

⁵⁹ S. Leulmi-pichot, Destruction de cellules cancéreuses par vibrations magnéto-mécaniques de micro/nano particules magnétiques: élaboration des particules par approche top-down, biofonctionnalisation et tests in-vitro, PhD thesis, Université Grenoble Alpes (2014).

⁶⁰ D. Bartczak and A.G. Kanaras, *Langmuir* **27**, 10119 (2011).

⁶¹ N. Patel, M.C. Davies, M. Hartshorne, R.J. Heaton, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, and P.M. Williams, *Langmuir* **13**, 6485 (1997).

⁶² M.J.. Wissink, R. Beernink, J.. Pieper, A.. Poot, G.H.. Engbers, T. Beugeling, W.. van Aken, and J. Feijen, *Biomaterials* **22**, 151 (2001).

⁶³ P. Rougé, R. Culerrier, V. Sabatier, C. Granier, F. Rancé, and A. Barre, *Mol. Immunol.* **46**, 1067 (2009).

⁶⁴ A. Barre, G. Jacquet, C. Sordet, R. Culerrier, and P. Rougé, *Mol. Immunol.* **44**, 3243 (2007).

⁶⁵ A. Barre, J.-P. Borges, R. Culerrier, and P. Rougé, *Immunol. Lett.* **100**, 153 (2005).

⁶⁶ A. Barre, J.-P. Borges, and P. Rougé, *Biochimie* **87**, 499 (2005).

⁶⁷ A. Foddai, C.T. Elliott, and I.R. Grant, *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7550 (2010).

⁶⁸ I. Special, C. On, and R. Interference, **2007**, 1 (2007).

⁶⁹ a Y. Fu, C. Spence, a Scherer, F.H. Arnold, and S.R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **17**, 1109 (1999).

⁷⁰ M. Kuhara, H. Takeyama, T. Tanaka, and T. Matsunaga, *Anal. Chem.* **76**, 6207 (2004).

⁷¹ M. Zborowski, G.R. Ostera, L.R. Moore, S. Milliron, J.J. Chalmers, and A.N. Schechter, *Biophys. J.* **84**, 2638 (2003).

⁷² H. Watarai, M. Suwa, and Y. Iiguni, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1693 (2004).

⁷³ X. Jin, Y. Zhao, A. Richardson, L. Moore, P.S. Williams, M. Zborowski, and J.J. Chalmers, *Analyst* **133**, 1767 (2008).

⁷⁴ C.P. Bean and J.D. Livingston, *J. Appl. Phys.* **30**, S120 (1959).

⁷⁵ G.C. Papaefthymiou, *Nano Today* **4**, 438 (2009).

⁷⁶ Q. a Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, and J. Dobson, *J. Phys. D ...* **167**, R167 (2003).

⁷⁷ G. Fonnum, C. Johansson, A. Molteberg, S. Mørup, and E. Aksnes, *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 41 (2005).

⁷⁸ S.S. Shevkoplyas, A.C. Siegel, R.M. Westervelt, M.G. Prentiss, and G.M. Whitesides, *Lab Chip* **7**, 1294 (2007).

⁷⁹ U.K. Veeramachaneni and R. Carroll, *COMSOL Conf. 2009 Bost.* (2009).

⁸⁰ I. Šafařík and M. Šafaříková, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **722**, 33 (1999).

⁸¹ S. Bhuvanendran Nair Gourikutty, C.P. Chang, and P.D. Puiu, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1011**, 77 (2016).

⁸² G.D. Moeser, K. a. Roach, W.H. Green, T.A. Hatton, and P.E. Laibinis, *AIChE J.* **50**, 2835 (2004).

⁸³ A.R. Abdel Fattah, S. Ghosh, and I.K. Puri, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1027**, 194 (2016).

⁸⁴ S.S. Leong, S.P. Yeap, and J. Lim, *Interface Focus* **6**, 20160048 (2016).

⁸⁵ J. Cordeiro, Assemblage thermodynamique de suspensions colloïdales: applications en nanophotonique et plasmonique 3D, PhD thesis, Université Grenoble Alpes (2014).

⁸⁶ T. Pinedo, Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné: applications en plasmonique, PhD thesis, Université Grenoble Alpes (2009).

⁸⁷ C. Bourges-Monnier and M.E.R. Shanahan, *Langmuir* **11**, 2820 (1995).

⁸⁸ M. Majumder, C.S. Rendall, J.A. Eukel, J.Y.L. Wang, N. Behabtu, C.L. Pint, T.-Y. Liu, A.W. Orbaek, F.

- Mirri, J. Nam, A.R. Barron, R.H. Hauge, H.K. Schmidt, and M. Pasquali, *J. Phys. Chem. B* **116**, 6536 (2012).
- ⁸⁹ C. V. Sternling and L.E. Scriven, *AIChE J.* **5**, 514 (1959).
- ⁹⁰ H. Hu, R.G. Larson, *Langmuir*, **21**, 9, 3963-3967 (2006).
- ⁹¹ M. Pianezza, E. Sellers, and R. Tyndale, *Nature* **393**, 1998 (1998).
- ⁹² F. Qian, A.J. Pascall, M. Bora, T.Y.J. Han, S. Guo, S.S. Ly, M.A. Worsley, J.D. Kuntz, and T.Y. Olson, *Langmuir* **31**, 3563 (2015).
- ⁹³ H.J.J. Yeh and J.S. Smith, *Proc. IEEE Micro Electro Mech. Syst.* **6**, 279 (1994).
- ⁹⁴ S.S. Choi, S.S. Stassi, A.P.A.P. Pisano, and T.I.T.I. Zohdi, *Langmuir* **26**, 11690 (2010).
- ⁹⁵ F. Fan and K.J. Stebe, *Langmuir* **20**, 3062 (2004).
- ⁹⁶ L. Malaquin, T. Kraus, H. Schmid, E. Delamarche, and H. Wolf, *Langmuir*, **23**, 23, 11513-11521 (2007).
- ⁹⁷ T.P. Rivera, O. Lecarme, J. Hartmann, E. Rossitto, K. Berton, and D. Peyrade, *J. Vac. Sci. Technol. B* **26**, 2513 (2008).
- ⁹⁸ J. Cordeiro, O. Lecarme, G. Osvaldo Dias, and D. Peyrade, *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **30**, 06F203 (2012).
- ⁹⁹ E. Picard, J. Cordeiro, K. Berton, D. Peyrade, and M. Zelsmann, brevet *EP 2942111A2*, (2015).
- ¹⁰⁰ T. Pinedo, Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné: applications en plasmonique, PhD thesis, Université Grenoble Alpes (2009).
- ¹⁰¹ J. Di Meglio, *Tech. l'Ingénieur NM3200*, (2007).
- ¹⁰² J.B. Lee, H.R. Gwon, S.H. Lee, and M. Cho, *Mater. Trans.* **51**, 1709 (2010).
- ¹⁰³ D. Dilip, N.K. Jha, R.N. Govardhan, and M.S. Bobji, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **459**, 217 (2014).
- ¹⁰⁴ T. Cosgrove, *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*, Blackwell: Oxford (2005).
- ¹⁰⁵ F. Charru, *Instabilités Hydrodynamiques*, CNRS Editions. EDP Sciences, (2007).
- ¹⁰⁶ A. Kumar and G.M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **63**, 2002 (1993).
- ¹⁰⁷ H. Schägger, *Nat. Protoc.* **1**, 16 (2006).
- ¹⁰⁸ J.A. Reynolds and C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **66**, 1002 (1970).
- ¹⁰⁹ C. Diaz-Vazquez, M.J. Torregrosa-Bertet, I. Carvajal-Urueña, A. Cano-Garcinuño, E. Fos-Escrivà, A. García-Gallego, F. López-Cacho, M.C. Monzón-Fueyo, X.M. Pérez-Porcuna, and M.L. Ridao-Redondo, *Pediatr. Allergy Immunol.* **20**, 601 (2009).
- ¹¹⁰ D.L. Leslie-Pelecky and R.D. Rieke, *Chem. Mater.* **8**, 1770 (1996).
- ¹¹¹ L.M. Lacroix, S. Lachaize, J. Carrey, M. Respaud, and B. Chaudret, *Actual. Chim.* **351**, 28-35 (2011).