



**HAL**  
open science

# Développement d'un microsystème bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie

Bruno Teste

► **To cite this version:**

Bruno Teste. Développement d'un microsystème bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie. Alimentation et Nutrition. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00610305

**HAL Id: pastel-00610305**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00610305>**

Submitted on 21 Jul 2011

**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 de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)**

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique  
de Paris Centre

Spécialité  
**Chimie Analytique**

Présentée par  
**Bruno TESTE**

pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

**Développement d'un microsystème bioanalytique  
intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au  
diagnostic de l'allergie**

Soutenance prévue le 14 Juin 2011, devant le jury composé de :

M. Jean-Louis Marty	Rapporteur
M. Christophe Marquette	Rapporteur
M. Vincent Studer	
Mme Claire-Marie Pradier	
M. Hubert Girault	
Mme Marie-Claire Hennion	Directrice de thèse
Mme Stéphanie Descroix	Membre invité



## Résumé

Dans le cadre du diagnostic de l'allergie, l'approche *in vitro* la plus utilisée consiste à quantifier les Immunoglobulines E (IgE) du patient par un immunodosage de type enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) à l'aide d'un support conventionnel : la plaque de microtitration. Ces méthodes sont utilisées du fait de leur grande spécificité et sensibilité. Bien que cette technique soit facile à mettre en œuvre et automatisable, elle nécessite des volumes de réactifs et d'échantillons importants (de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{L}$ ) et est limitée par le transfert de masse des analytes vers la surface du support générant ainsi des temps d'analyse élevés. Notre travail a consisté à élaborer un microsystème bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques et dédié au diagnostic de l'allergie au lait. Les nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec la molécule de capture, l'antigène dans notre cas, sont utilisées en tant que support de l'interaction et permettent ainsi de capturer la cible (IgE) en phase colloïdale. La réduction de la taille du support vers des échelles nanométriques permet d'augmenter le rapport surface sur volume et de réduire les distances de diffusion. Ainsi, la cinétique d'interaction entre la molécule de capture et la cible est accélérée par rapport à des supports milli ou micrométriques. Après l'étape de capture de la molécule cible, les nanoparticules et donc la cible sont séparées des molécules interférentes et préconcentrées au sein d'une chambre magnétique avant l'étape de détection. En effet, cette chambre magnétique, composée de billes de fer ferromagnétiques, permet le confinement magnétique des nanoparticules. Ainsi, le microsystème que nous avons développé a permis de diminuer les temps d'analyse d'un facteur 25 et de consommer 50 fois moins d'échantillon par rapport à un ELISA conventionnel réalisé en plaque de microtitration. Ceci est d'autant plus critique que l'on travaille dans un contexte d'allergie au lait qui concerne les jeunes enfants. L'immunodosage des IgE spécifiques au sein des sérums de patients allergiques au lait et la comparaison des résultats avec une méthode de référence a permis de valider ce microsystème bioanalytique en tant qu'outil de diagnostic de l'allergie.

## Summary

In the field of allergy diagnosis, the most used *in vitro* approach consists in quantifying Immunoglobulin E (IgE) in patient sera using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in conventional microtiter plate. The immunochemical techniques have been chosen since they provide high specificity and sensitivity. Although these approaches are easy to use and allow automation, they required high sample volume (100  $\mu\text{L}$ ) and suffer from mass transfer limitations which lead to long assay time. In that way, we have developed a bioanalytical microsystem integrating magnetic nanoparticles dedicated to milk allergy diagnosis. The nanoparticles, previously functionalized with the capture molecule (antigen in our case) were used as immunosupport thus allowing target (IgE) capture in colloidal phase. The reduction of the immunosupport to nanometric scale was responsible of an increase of surface to volume ratio and a decrease of diffusion distances, thus the interaction kinetic between the capture molecule and the target are improved compared to macro and micro sized support. After the target capture, the nanoparticles and therefore the target are separated from the matrix and preconcentrated in a magnetic chamber before the detection step. Indeed, this magnetic chamber, made of ferromagnetic beads, allow the trapping of the magnetic nanoparticles. Thus, the developed microsystem was able to determine IgE concentration with a 25 fold reduction of assay time as well as a 50 times reduced sample consumption compared to conventional microtiter plate. This last point is crucial since the milk allergy is mainly observed in children. The quantification of IgE in real sera conditions and the results comparison to gold standard validated the developed microsystem as a tool for allergy diagnosis.

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I°) Contexte de l'étude : diagnostic de l'allergie</b> .....	<b>5</b>
I.1°) Antigènes et anticorps : molécules de l'immunité.....	5
I.1.1°) <i>Le système immunitaire chez l'Homme</i> .....	5
I.1.2°) <i>Les antigènes</i> .....	5
I.1.3°) <i>Les anticorps</i> .....	7
I.1.4°) <i>La réaction antigène-anticorps et conséquences in vivo</i> .....	9
I.2°) Généralités sur l'allergie .....	11
I.2.1°) <i>Les mécanismes de l'allergie</i> .....	11
I.2.2°) <i>Importance de l'allergie alimentaire</i> .....	12
<b>II°) Les immunoessais : systèmes analytiques basés sur l'interaction entre un antigène et un anticorps</b> .....	<b>14</b>
II.1°) Techniques basées sur la précipitation et l'agglutination des immunocomplexes .....	15
II.1.1°) <i>L'immunoprécipitation</i> .....	15
II.1.2°) <i>L'immunoagglutination</i> .....	18
II.2°) Techniques basées sur la réaction primaire entre un antigène et un anticorps .....	20
II.2.1°) <i>Immunoessais en phase hétérogène</i> .....	20
II.2.2°) <i>Immunoessais en phase homogène</i> .....	26
II.3°) Les tests de diagnostic de l'allergie .....	29
II.3.1°) <i>Les tests in vivo</i> .....	30
II.3.2°) <i>Les tests in vitro</i> .....	30
<b>III°) Intégration des immunoessais à l'échelle du microsystème</b> .....	<b>32</b>
III.1°) Les microsystèmes et les techniques de microfabrication .....	32
III.1.1°) <i>Présentation des microsystèmes</i> .....	32
III.1.2°) <i>Les techniques de microfabrication</i> .....	33
III.2°) Transposition des immunoessais au format microsystèmes .....	37
III.2.1°) <i>Immunoessais en phase hétérogène à l'échelle microfluidique</i> .....	38
III.2.2°) <i>Immunoessais en phase homogène à l'échelle microfluidique</i> .....	48
<b>IV°) Les nanoparticules : plateformes nanométriques appliquées aux immunoessais</b> .....	<b>57</b>
IV.1°) Les nanoparticules d'or .....	58
IV.2°) Les nanofilaments .....	63
IV.3°) Les nanoparticules d'oxyde de fer .....	65
<b>V°) Références :</b> .....	<b>72</b>

# CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET FONCTIONNALISATION DE LA NANOPATEFORME DE TYPE CŒUR COQUILLE SUPPORT DE L'IMMUNOESSAI

<b>I°) Introduction .....</b>	<b>79</b>
<b>II°) Synthèse des nanoparticules cœur-coquille .....</b>	<b>81</b>
II.1°) Synthèse du cœur magnétique d'oxyde de fer.....	81
II.2°) Formation de la coquille de silice.....	83
II.3°) Fonctionnalisation chimique de la surface des nanoparticules cœur-coquille .....	84
<b>III°) Caractérisation des nanoparticules cœur-coquille .....</b>	<b>85</b>
III.1°) Mesure de la taille .....	85
III.2°) Propriétés magnétiques .....	86
III.3°) Caractérisation de l'état de surface des nanoparticules.....	87
III.4°) Stabilité colloïdale et mouvement brownien.....	89
<b>IV°) Greffage de l'antigène à la surface des nanoparticules .....</b>	<b>91</b>
IV.1°) Choix de l'antigène et méthode de greffage .....	91
IV.2°) Optimisation du greffage covalent de protéines à la surface de nanoparticules par approche chimiométrique.....	94
IV.2.1°) <i>Préambule</i> .....	94
IV.2.2°) <i>Article 1</i> .....	96
IV.2.3°) <i>Autres facteurs influençant le greffage de l'antigène</i> .....	104
<b>V°) Conclusion .....</b>	<b>107</b>
<b>VI°) Références : .....</b>	<b>108</b>

## **CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNOESSAI EN BATCH UTILISANT DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES ET DEDIE AU DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE**

<b>I°) Introduction .....</b>	<b>111</b>
<b>II°) Article 2 .....</b>	<b>113</b>
<b>III°) Conclusion .....</b>	<b>149</b>

## **CHAPITRE 4 : ELABORATION DU MICROSYSTEME ET INTEGRATION DE L'IMMUNOESSAI A L'ECHELLE MICROFLUIDIQUE**

<b>I°) Introduction .....</b>	<b>151</b>
<b>II°) Développement d'un microsysteme offrant de grands gradients de champ magnétique dédié à la capture de nanoparticules cœur-coquille.....</b>	<b>152</b>
II.1°) Préambule et théorie sur le magnétisme .....	152
II.2°) Article 3 .....	158
<b>III°) Développement d'un microsysteme bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie .....</b>	<b>173</b>
III.1°) Préambule et résultats préliminaires .....	173
III.2°) Article 4 .....	177
<b>IV°) Conclusion .....</b>	<b>192</b>
<b>V°) Références : .....</b>	<b>193</b>

<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>195</b>
---	------------

# ANNEXES

Annexe 1 : Synthèse des nanoparticules de Maghémite .....	201
Annexe 2 : Synthèse des nanoparticules cœur-coquille .....	202
Annexe 3 : Dosage des fonctions amines par le Kaiser test.....	204
Annexe 4 : Dosage des protéines greffées sur les nanoparticules.....	206
Annexe 5 : Article 5 : Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particle by capillary electrophoresis .....	207
Annexe 6 : Traitement de surface du PDMS .....	218
Annexe 7 : Spectres Infrarouge pour évaluer la présence du PDMA-AGE .....	219



## Liste des abréviations :

$\alpha$ -lac	$\alpha$ -lactalbumine
$\mu$ -TAS	Micro total analysis system
Ac	Anticorps
AFB	Aflatoxine B1
AFP	$\alpha$ -foeto protéine
AG	Argent
Ag	Antigène
Au	Or
<b>B</b>	Densité de flux magnétique
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA	Bovine serum albumin
CD	Compact disc
CEA	Carcinoembryonic antigen
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DLS	Dynamic light scattering
EC	Electrophorèse capillaire
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fc	Ferrocène
FITC	Fluorescein isothiocyanate
<b>Fmag</b>	Force magnétique
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>H</b>	Champ magnétique
HCG	Hormone gonadotrophine chorionique
HGMS	High gradient magnetic separation
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunoglobuline
ITP	Isotachophorèse
LB	Lymphocyte B
LFD	Lateral flow device
LT	Lymphocyte T
MCSNP	Magnetic core shell nanoparticle
MIA	Micromosaic immunoassay
MMP-8	Matrix metalloproteinases
MP	Microplate
NPCC	Nanoparticule cœur coquille
<i>OPD</i>	Ortho Phenylenediamine
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenyl Phosphate
PSA	Prostate specific antigen
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QD	Quantum dots
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SERS	Surface enhanced Raman scattering
SPR	Surface Plasmon resonance
VDW	VanDerWaals

# INTRODUCTION

L'allergie ou réaction d'hypersensibilité immédiate de type I est une exacerbation de la réponse immunitaire vis à vis de substances inoffensives communes : les allergènes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'allergie figure au 4ème rang des maladies les plus fréquentes dans le monde. Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique à impact sociétal, économique, médical et scientifique. Dans ce contexte, l'allergie alimentaire est aujourd'hui une véritable préoccupation dans les pays industrialisés. En effet ce type d'allergie est de plus en plus fréquent. Les allergies alimentaires touchent environ cinq pour cent des enfants et les aliments mis en cause sont toujours plus nombreux, les symptômes allant de l'asthme à l'eczéma jusqu'aux chocs anaphylactiques pouvant entraîner la mort du patient. Des outils diagnostics commerciaux, basés sur la technique des immunoessais, permettent de quantifier l'un des biomarqueurs de l'allergie : l'immunoglobuline E (IgE) présente dans le sérum des patients. Les tests de diagnostic de l'allergie les plus employés sont les tests ImmunoCAP® (format ELIFA pour Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay, [www.phadia.fr](http://www.phadia.fr)). Le sérum d'un patient est alors incubé dans une éponge sur laquelle l'allergène d'intérêt est fixé, puis les anticorps (IgE) ayant réagi avec cet allergène sont quantifiés par une technique d'immunodétection. Ces kits commerciaux sont disponibles pour plus de 450 allergènes, mais les temps et les coûts d'analyse ainsi que la consommation des réactifs restent élevés.

Dans un contexte clinique, le diagnostic devrait pouvoir être établi de façon rapide, peu coûteuse tout en offrant une sensibilité élevée. Pour ce faire, l'une des alternatives aux méthodes conventionnelles repose sur la miniaturisation des supports analytiques appelés microsystèmes (ou laboratoire sur puce). Issus du monde de la microélectronique, ces microsystèmes pour l'analyse totale (micro total analysis system ou  $\mu$ TAS) permettent d'intégrer, dans un système dont au moins l'une des dimensions est micrométrique, l'ensemble des étapes de la procédure analytique : préconcentration, séparation, détection et quantification avec un haut débit d'analyses et un haut niveau d'automatisation. L'avènement de la lithographie douce pour le polydiméthylsiloxane (PDMS), introduite au milieu des années 90, a permis à la microfluidique de prendre tout son essor. La simplicité extrême et l'impressionnante robustesse de ce procédé permettent à des scientifiques de tous horizons et ne disposant pas des structures habituellement requises pour la fabrication d'objets à cette échelle, de se lancer dans l'aventure. Les techniques de microfabrication permettent d'élaborer des microsystèmes dont l'architecture peut s'adapter aux besoins analytiques. Ainsi des échantillons très variés de la molécule au tissu en passant par la cellule ont pu être étudiés en

système microfluidique. Différents avantages sont souvent mis en avant pour les microsystèmes. Il s'agit tout d'abord du grand rapport surface sur volume qui permet de diminuer les distances de diffusion et donc les temps d'analyse. La réduction des dimensions du système analytique permet également de réduire les volumes d'échantillons et de réactifs à l'échelle du microlitre ou du nanolitre. Enfin, la possibilité offerte par les procédés de microfabrication de concevoir son propre dispositif permet de réaliser des microsystèmes en fonction des besoins spécifiques de chaque problématique analytique.

Le diagnostic de l'allergie n'a pas échappé à la déferlante microfluidique, ainsi certains exemples de  $\mu$ TAS ont montré que le développement d'outils microfluidiques pouvait être une alternative intéressante pour le dosage des IgE totales ou spécifiques d'un allergène précis.

En parallèle, les nanoparticules magnétiques ont également connu un essor grandissant dans les domaines de la physique, de la chimie et de la biologie. Dans le domaine du diagnostic, ces nanoparticules sont notamment utilisées *in vivo* pour l'imagerie médicale ou la vectorisation. Elles ont également été utilisées dans le cadre de diagnostics *in vitro* et tout particulièrement pour les immunoessais. Leur chimie de surface, qui peut être modifiée et adaptée pour le greffage de biomolécules d'intérêt ainsi que leur stabilité colloïdale qui permet d'améliorer la diffusion des espèces, en font d'excellents supports de capture ou de détection pour le développement d'immunoessais. Leurs propriétés magnétiques permettent quant à elles de mettre en œuvre différentes méthodes : magnétophorèse, agglutination ou tout simplement de les confiner...

Dans le cadre du projet Soludiag (ANR blanche 2007-2011), plusieurs laboratoires (ex-LI2C, ex-LECA (ENSCP), ex-LECA (ESPCI) et MMN) ont mis en commun leurs compétences pour développer un microsystème intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie au lait. Le dispositif proposé combine à la fois les avantages des immunoessais en phase homogène (diffusion des deux partenaires de la réaction immunologique) et ceux de la phase hétérogène (étapes de préconcentration et de séparation simplifiées).

En effet, la première étape consistant à capturer les IgE s'effectue en suspension en tirant profit du caractère colloïdal et du mouvement brownien des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec la molécule de capture. Une fois les IgE capturées à la surface des nanoparticules, ces dernières sont séparées de leur matrice et concentrées au sein d'une chambre magnétique avant l'étape finale de détection. La mise en œuvre de ce type de microsystème devrait permettre de diminuer les temps d'analyse tout en réduisant fortement la consommation d'échantillons et de

réactifs. La diminution du volume de l'échantillon est particulièrement critique dans notre cas d'étude qui porte sur l'allergie au lait. En effet, ce type d'allergie concerne majoritairement les enfants en bas âge pour lesquels nous disposons de faibles volumes de sérum.

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la synthèse et à la caractérisation des nanoparticules magnétiques qui seront utilisées comme support de l'immunoessai. En effet, la chimie de surface de ces objets a tout d'abord été caractérisée avant d'aborder les conditions et l'optimisation du greffage de l'antigène, molécule de capture, à la surface de cette nanoplateforme. Un plan d'expériences a été mis en œuvre afin d'optimiser le greffage de l'antigène de capture à la surface des nanoparticules. Les conditions de stabilité de ces objets ont également été étudiées.

Par la suite, un immunoessai dédié au diagnostic de l'allergie, basé sur l'utilisation de ces nanoparticules, a été développé dans un premier temps en batch. Au cours de cette étude, les performances obtenues avec les nanoparticules ont été comparées à celles obtenues avec des supports milli et micrométriques, et ce notamment en terme de cinétique d'interaction et de sensibilité. L'influence de la chimie de surface des nanoparticules sur les performances de l'immunoessai a également été évaluée. Cet immunoessai a été mis en œuvre pour l'analyse de sérums de patients puis comparé aux méthodes d'ELISA conventionnelles.

Enfin, l'ensemble de l'immunoessai caractérisé en batch a été intégré au sein d'un microsystème analytique. Pour ce faire, nous avons dû développer une fonctionnalité dédiée au confinement des nanoparticules magnétiques notamment pour les étapes de séparation et de préconcentration de la molécule cible (IgE) précédant l'étape de détection. Différents formats de l'immunoessai ont été envisagés afin d'évaluer plus avant les avantages liés au caractère colloïdal et magnétique du support de l'interaction antigène/anticorps.



# CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## I) Contexte de l'étude : diagnostic de l'allergie

### I.1°) Antigènes et anticorps : molécules de l'immunité

#### *I.1.1°) Le système immunitaire chez l'Homme*

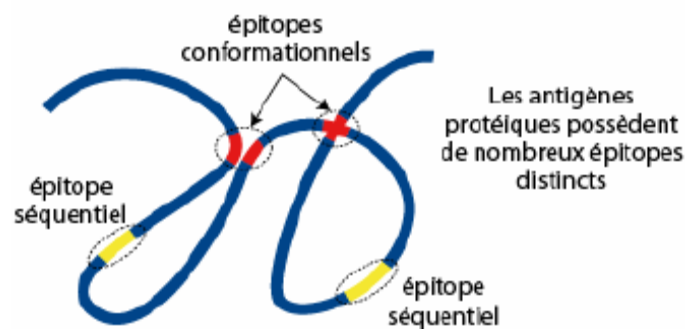
Le système biologique de défense contre les dommages potentiels des micro-organismes et des antigènes comprend l'immunité innée (non spécifique) et l'immunité acquise (spécifique). L'immunité non spécifique recrute des molécules et des cellules à large spectre d'action qui ne font pas intervenir de spécificité de reconnaissance avec les corps étrangers. Parmi ces molécules de défense notons le lysozyme ou encore le système du complément qui assurent la lyse des micro-organismes infectieux. Parmi les cellules non spécifiques de défense on trouve les macrophages ou phagocytes qui jouent un rôle essentiel de défense, grâce à des mécanismes d'endocytose, ils peuvent 'absorber' des antigènes et même des micro-organismes pour les dégrader en leur sein.

L'immunité spécifique fait intervenir une reconnaissance particulière entre les molécules intrusives et les molécules ou cellules de défense. L'antigène est initialement pris en charge par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) qui sélectionne, recrute et active en cascade deux classes de lymphocytes spécifiques de l'antigène : les lymphocytes T (LT) qui ont un rôle d'activation et de contrôle de l'activation cellulaire mais aussi un rôle de destruction des cellules microbiennes (LT cytotoxique) et les lymphocytes B (LB) qui produisent les anticorps. Intéressons nous aux molécules de l'immunité spécifique : les anticorps et leur cible qui sont les antigènes avant de s'attarder sur les mécanismes de l'allergie.

#### *I.1.2°) Les antigènes*

On appelle antigène (Ag) toutes les molécules du non soi, c'est-à-dire les molécules étrangères à l'organisme, qui vont déclencher des réactions immunitaires chez les individus, on parle alors de réponse cellulaire ou humorale. Cette réponse humorale consiste en la production d'anticorps (Ac) dirigés spécifiquement contre les Ag.

On parle d'immunogénicité pour évaluer la capacité d'un Ag à susciter une réponse immunitaire et d'antigénicité pour évaluer la capacité qu'à un Ag à réagir avec un Ac. Les Ac reconnaissent une ou plusieurs parties de la structure de l'Ag que l'on appelle les épitopes. Un épitope est une structure susceptible d'être reconnue par un récepteur spécifique. Cela met en jeu une interaction dépendant de plusieurs liaisons chimiques faibles. Ainsi, sur la surface d'une protéine, un épitope peut inclure un ensemble d'acides aminés (de 4 à 8) impliqués directement dans la liaison Ag-Ac. Les Ac présents dans le sérum et ceux qui sont fixés sur la membrane des LB font partie des récepteurs spécifiques. Pour une protéine, l'épitope est dit séquentiel lorsqu'il est défini par une séquence d'acides aminés ou conformationnel lorsque deux séquences distinctes sont rapprochées dans l'espace (Figure 1). Un Ag est donc porteur de plusieurs épitopes plus ou moins immunogènes générant plusieurs types d'Ac, donc faisant intervenir plusieurs types de LB : la réponse est dite polyclonale. Les Ac polyclonaux sont un mélange d'Ac pouvant réagir contre plusieurs épitopes d'un même Ag. Au contraire, un Ac monoclonal réagira contre un seul épitope d'un Ag donné.



**Figure 1. Représentation schématique des épitopes séquentiels et conformationnels des antigènes. Extrait de [1].**

Des petites molécules appelées haptènes (inférieures à 5000 Da) ne peuvent pas induire de réponse immunitaire lorsqu'elles sont injectées seules (elles ne sont pas immunogènes). Cependant, lorsqu'elles sont injectées couplées chimiquement avec une macromolécule immunogène (molécule « porteuse », en général une protéine), les haptènes, en créant de nouvelles caractéristiques structurales à la surface de la molécule porteuse, sont reconnus par des Ac spécifiques. Ces derniers peuvent également reconnaître l'haptène libre. Donc un haptène n'est pas immunogénique, mais il est antigénique. Les haptènes sont des petites molécules, naturelles ou synthétiques comme les hormones, les toxines, certains médicaments, les herbicides ou encore les pesticides.

1.1.3°) Les anticorps

Les Ac sont des glycoprotéines faisant partie de la famille des immunoglobulines (Ig) sécrétées par les plasmocytes issus de la différenciation des LB. Ces Ig sont constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures, chacune de ces chaînes étant constituée d'une partie constante et d'une partie variable (Figure 2). La partie Fc (pour fragment cristallisable) représente la partie constante des Ac au sein d'une classe, ce fragment est constitué des domaines constants de la chaîne lourde (excepté le premier) alors que la partie Fab (pour antigen binding) est composée du domaine variable et du premier domaine constant de chacune des chaînes.

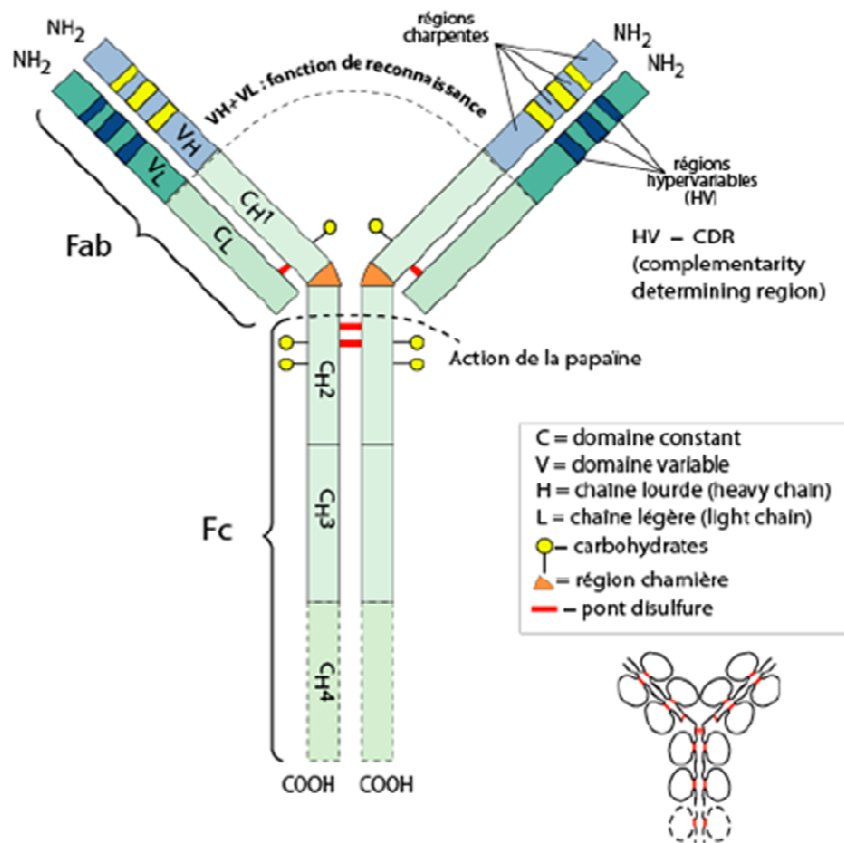


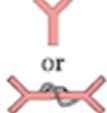




Figure 2. Représentation schématique de la structure des anticorps. Extrait de [1].

Chez les mammifères il existe plusieurs classes d'Ig (Figure 3) définies par la région constante, elles ont chacune un rôle immunitaire différent et sont synthétisées en des temps différents pendant la réaction immunitaire.



Class (Isotype)	IgG (4 subclasses)	IgM	IgA (2 subclasses)	IgD	IgE
Heavy chains	$\gamma$ ( $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$ )	$\mu$	$\alpha$ ( $\alpha 1, \alpha 2$ )	$\delta$	$\epsilon$
Light chains	$\kappa$ or $\lambda$	$\kappa$ or $\lambda$	$\kappa$ or $\lambda$	$\kappa$ or $\lambda$	$\kappa$ or $\lambda$
% serum Ig	$\pm 75\%$	$\pm 10\%$	$\pm 15\%$	$\pm 1\%$	0.002%
kDa	$\pm 150$	$\pm 950$	$\pm 160$ ou $400$	$\pm 180$	$\pm 190$
					

**Figure 3. Caractéristiques des différentes immunoglobulines. Extrait de [1].**

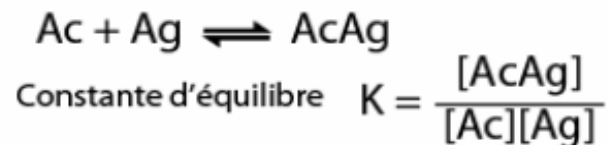
La partie constante des chaînes lourdes définit la classe de l'Ig ou isotype. Chez les mammifères, il existe 5 classes d'Ig, avec des chaînes lourdes spécifiques ( $\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$ , incluant deux sous-classes pour  $\alpha$  et quatre pour  $\gamma$ ). Il y a seulement deux types de chaînes légères :  $\kappa$  et  $\lambda$ . Chez l'homme, 25% des IgA sont dimériques et toutes les IgM sont pentamériques. Les Ig les plus utilisées dans les techniques immunochimiques sont les IgG qui représentent 75% des Ig totales du sérum chez l'humain.

Chaque chaîne d'Ig est formée de plusieurs domaines (environ 110 acides aminés) caractérisés par une structure tertiaire stabilisée par un pont disulfure intracaténaire. La séquence en acides aminés des parties constantes d'une chaîne est identique pour tous les membres d'une classe ou d'une sous-classe. Les chaînes légères possèdent une seule région constante. Les chaînes lourdes peuvent en posséder 3 (IgG, IgA, IgD) ou 4 (IgM, IgE). En revanche les parties variables sont caractéristiques de chaque Ig et constituent l'idiotype. Un Ac possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère constitue le site de reconnaissance de l'Ac ou paratope. Ainsi, une molécule d'Ig possède deux sites de liaison à l'Ag, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'Ag par Ac. La fonction de reconnaissance des paratopes est assurée par des structures de conformations spécifiques qui assurent une reconnaissance stérique de l'Ag (modèle clé-serrure).

### 1.1.4°) La réaction antigène-anticorps et conséquences *in vivo*

Ces interactions sont de nature non covalentes, il y a une reconnaissance structurale entre les paratopes des Ac et les épitopes de l'Ag. Cette reconnaissance est favorisée par des liaisons faibles incluant les liaisons hydrophobes, de Van Der Waals, hydrogènes et électrostatiques.

Cette interaction est régie par l'équilibre suivant :



Le complexe Ag-Ac peut être dissocié aux valeurs extrêmes de pH ou à force ionique élevée par l'utilisation de sels chaotropiques (MgCl<sub>2</sub>, KSCN...). On utilise ces conditions de dissociation notamment en chromatographie d'affinité pour éluer les analytes. On utilise le terme affinité pour désigner la force de liaison entre un épitope et un paratope alors que l'avidité désigne l'affinité entre un mélange d'Ac et plusieurs épitopes d'un Ag (cas du couple avidine/biotine).

Parfois, un Ac réagit avec l'épitope d'un Ag qui n'est pas l'allergène originel, ceci est dû à la similarité entre les épitopes d'allergènes différents. Cette réaction croisée présente un intérêt clinique car elle est à la base de nombreux vaccins, mais devient source de problèmes pour les techniques de dosages immunochimiques. Le plus souvent il est possible d'éliminer ces Ac responsables de la réaction croisée par des techniques séparatives comme la chromatographie d'affinité.

Les Ac peuvent aider à l'élimination ou à la neutralisation de micro-organismes ou de molécules (Figure 4). On peut classer ces activités en 2 groupes : le premier mode d'action implique la fonction de reconnaissance du paratope seulement. En recouvrant les toxines ou les virus, les Ac les empêchent de se lier à leurs récepteurs cibles. Le second mode d'action combine la fonction du paratope avec celle permettant aux Ac de se fixer sur les récepteurs Fc. Ceci permet par exemple de faciliter l'action des phagocytes et des cellules Natural Killer (NK). Ces dernières sont capables de tuer les micro-organismes et les cellules infectées sans phagocytose préalable. La présence de ces récepteurs pour la partie Fc de l'Ig sur les cellules NK et les macrophages favorise l'action des ces deux catégories cellulaires. Un autre exemple est celui de la fixation du complément par

l'intermédiaire des IgM ou des IgG, qui aboutit à la lyse des Ag recouverts par ces Ac. Le complément est un système protéique complexe comportant plus de 20 constituants, dont la plupart sont des enzymes. Ces constituants se trouvent dans la circulation sanguine et peuvent s'associer avec les Ac pour initier une réaction en chaîne aboutissant à la destruction des Ag reconnus. Un autre exemple est fourni par les IgE. Les mastocytes et les basophiles possèdent des récepteurs de haute affinité pour la partie Fc des IgE. Si un Ag est reconnu par des IgE fixées sur ces cellules, cela déclenche une libération massive de médiateurs, dont l'histamine, qui provoque une inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire,...) mais qui est également la cause des symptômes de l'allergie.

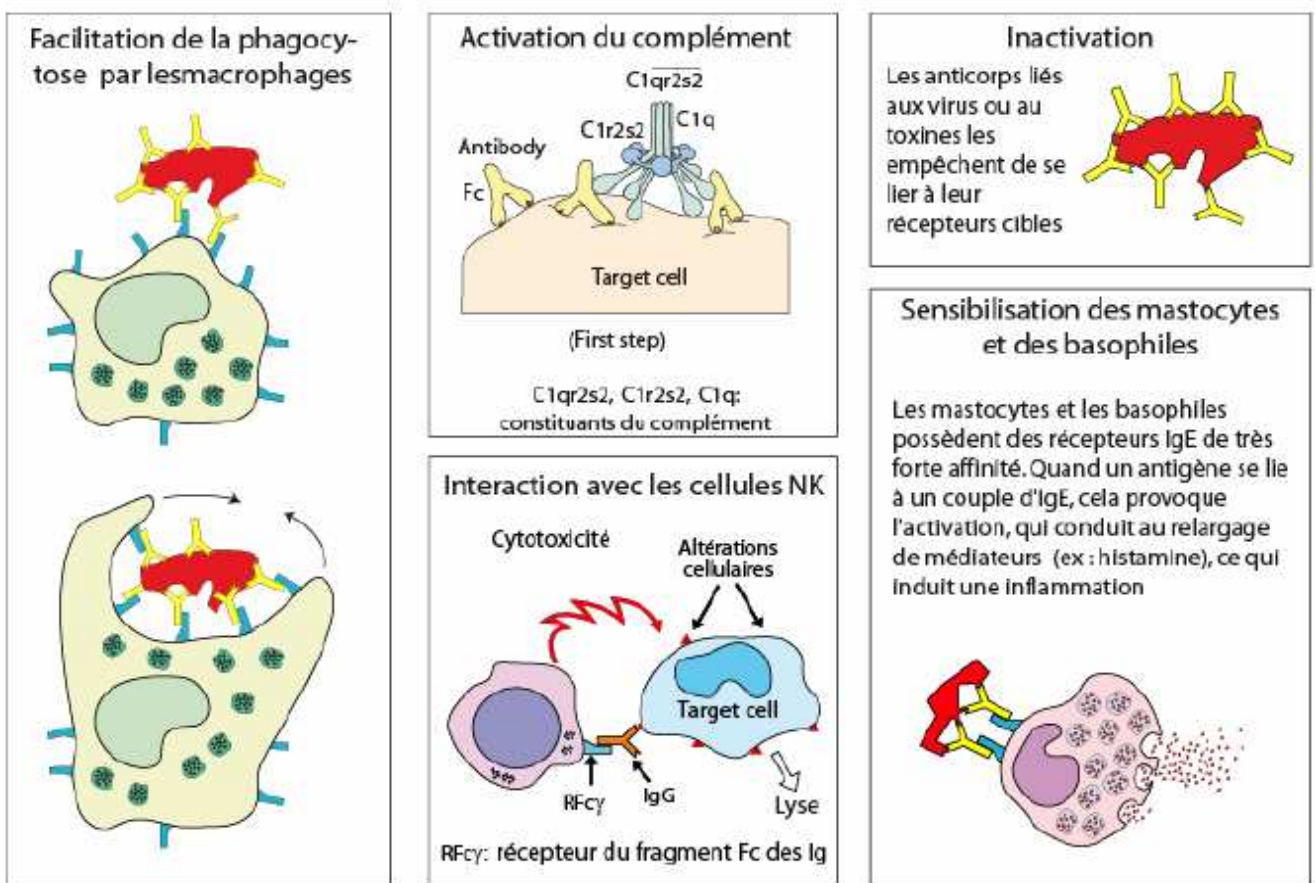


Figure 4. Actions in vivo des anticorps. Extrait de [1].

## I.2°) Généralités sur l'allergie

### I.2.1°) Les mécanismes de l'allergie

Nous venons de présenter les deux molécules impliquées dans la spécificité de reconnaissance dans le cadre de l'immunité spécifique : l'Ag et l'Ac. L'allergie correspond à une réponse immunitaire exacerbée et orientée vers la production d'IgE chez les individus génétiquement prédisposés. L'Ag incriminé est alors appelé allergène. Ces deux molécules font partie d'un système complexe lors des réactions allergiques (Figure 5). Ces allergènes sont présents dans tous les secteurs : environnementaux, agroalimentaires, pharmaceutiques... Ce sont des macromolécules (protéines, peptides, acides nucléiques, lipides, glucides...) à l'état libre ou présentes à la surface de micro-organismes et de virus.

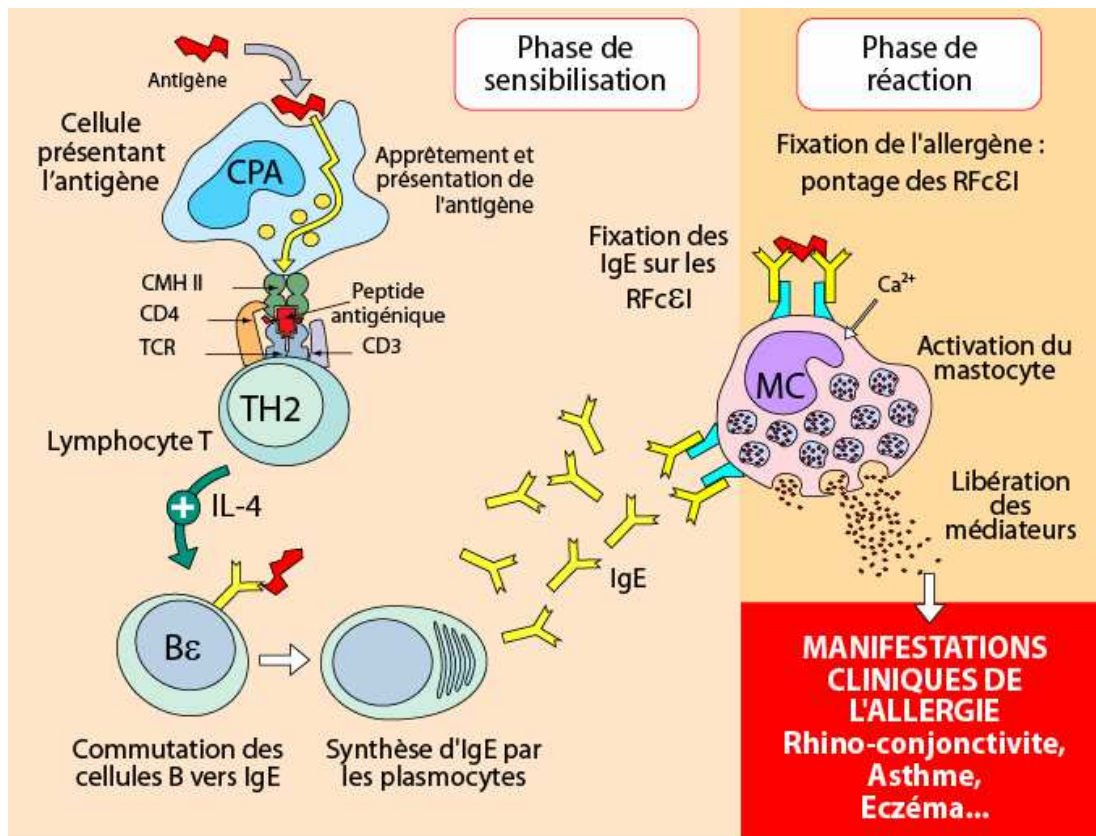


Figure 5. Les mécanismes de l'allergie chez l'Homme. Extrait de [1].

Les allergènes, le plus souvent de nature protéique, une fois dans les tissus sont endocytés par des cellules spécialisées : les cellules présentatrices d'Ag (CPA) (macrophages ou cellules dendritiques) où ils sont hydrolysés en peptides. Certains peptides sont exposés en surface avec les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) pour être présentés aux lymphocytes TH2. Après avoir été activés par le contact avec l'Ag, les lymphocytes TH2 vont relarguer des médiateurs chimiques (interleukine (IL-4) entre autre) qui vont induire la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'Ac (ou Ig), préférentiellement les IgE. Les IgE vont pouvoir se fixer sur les récepteurs membranaires de certaines cellules comme les mastocytes. Lorsque l'allergène est réintroduit pour la seconde fois dans l'organisme, il va pouvoir se fixer sur les IgE présentes sur les mastocytes. Cette formation du complexe Ag-Ac à la surface de ces cellules va engendrer des cascades de réactions aboutissant à la dégranulation du mastocyte, c'est-à-dire au relargage de certains médiateurs de la réponse immunitaire et de l'inflammation comme l'histamine présente dans les vésicules des mastocytes. L'effet de ces médiateurs sur l'organisme est immédiat et engendre des symptômes tels que l'eczéma, l'asthme et jusqu'au cas extrême de choc anaphylactique.

Comprendre les interactions *in vivo* entre Ag et Ac permet de mettre en place des techniques de dosage pour l'immunodiagnostic qui seront basées sur le même principe d'interaction. Les techniques chimiques basées sur la reconnaissance Ag/Ac sont appelées techniques immunochimiques.

### *1.2.2°) Importance de l'allergie alimentaire*

Depuis 20 ans, les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes et complexes [2, 3]. Bien que leur prévalence soit surestimée par le grand public car elles sont confondues avec des hypersensibilités (déficience en enzyme par exemple) ne faisant pas intervenir de mécanisme immunologique, elles concernent tout de même environ 5% des enfants et 3% des adultes. Il existe cependant des disparités importantes en fonction des pays, de l'âge et des habitudes de consommation.

Les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte sont présentés dans le Tableau 1. Au-delà de trois ans, l'arachide est le premier allergène. Il est d'autant plus important qu'il est le premier responsable des anaphylaxies sévères déclarées par le réseau d'allergovigilance en France et en Belgique (11,5% en 2007).

Allergènes	0-1 an	1-3 ans	3-15 ans	Adultes
Œuf	77,5 (%)	69,9	24,3	6,3
Lait	29,2	25,6	7	3,5
Arachide	19,7	37,6	49,3	10,1
Fruits à coques	2,7	4,4	10,2	15,7
Légumineuses	0,6	4,4	13,4	5,9
Poisson	0,6	5	10	3,1
Prunoïdées	0	0	0	31,3
Avocat, banane, châtaigne, kiwi	0,6	1,3	5,3	22,6
Apiacées	0	0	1,7	16,4
Blé, céréales	6,1	6,4	2,7	13,2

**Tableau 1. Allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte (données du Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire). Adapté de [2].**

Chez l'enfant, le lait de vache est le deuxième aliment responsable d'allergies derrière l'œuf, mais son importance est primordiale car il reste le premier aliment des nourrissons. L'allergie au lait de vache débute souvent avant l'âge de six mois mais disparaît généralement au cours de l'enfance après éviction du lait du régime alimentaire. Les protéines du lait de vache peuvent être séparées en deux fractions par acidification : le lactosérum et le lait caillé ou coagulé. La composition en protéines de ces deux fractions, leurs points isoélectriques et leurs masses moléculaires, ainsi que le taux de patients qui y sont sensibilisés sont présentés dans le tableau 2.

Protéines	% des protéines du lait total	Point isoélectrique	Masse moléculaire (kDa)	% des patients sensibilisés
Lait caillé	Caséine $\alpha$ 1	32	5	66
	Caséine $\alpha$ 2	10	5,3	
	Caséine $\beta$	28	5,2	
	Caséine $\kappa$	10	5,5	
Lactosérum	$\beta$ -lactoglobuline A	10	5,25	58
	$\beta$ -lactoglobuline B		5,35	
	$\alpha$ -lactalbumine	5	4,2-4,5	38
	Immunoglobulines	1	5,5-6,8	n.d.
	BSA (albumine)	3	4,7-4,9	66
	Lactoferrine	traces	8,3	78

**Tableau 2. Composition des différentes fractions du lait en protéines et taux de patient y étant sensibilisés. Adapté de [2].**

La plupart des protéines du lait font réagir plus de la moitié des patients allergiques au lait : ce sont des allergènes dit majeurs. En outre, de nombreux patients sont sensibilisés à plusieurs de ces protéines. Les allergies sont un problème de santé publique au niveau mondial, on comprend facilement l'utilité de développer des techniques spécifiques et sensibles facilitant leur diagnostic.

## **II°) Les immunoessais : systèmes analytiques basés sur l'interaction entre un antigène et un anticorps**

Les immunoessais, également appelés dosages immunologiques, sont des techniques utilisant la propriété de reconnaissance spécifique entre un Ag et un Ac pour doser l'un des deux.

La description de ces techniques peut s'effectuer selon différentes approches. Nous avons dans le cas présent décidé de classer les immunoessais selon le type de réactions mises en jeu. Ces techniques peuvent également être abordées selon le type de format envisagé : format compétitif ou non compétitif ou selon le type de milieu employé, en phase homogène ou hétérogène. Le choix du

format ou du type de milieu, que nous décrirons par la suite, influe sur les paramètres et les performances analytiques.

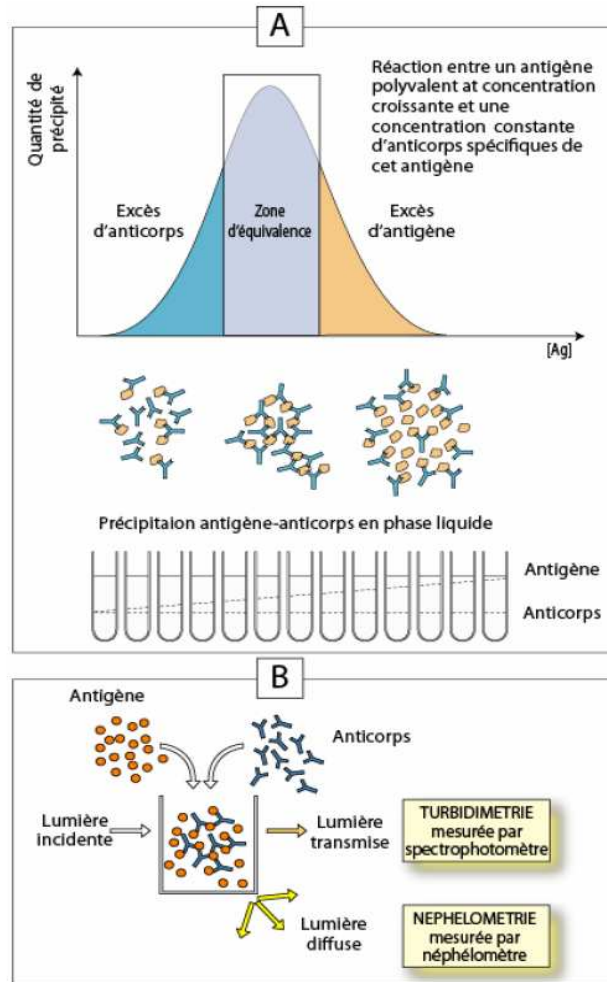
Les immunoessais peuvent être divisés en 2 groupes, selon le type de réaction sur laquelle ils sont basés. Dans le premier groupe, on utilise les effets engendrés par la formation du complexe, comme la précipitation ou l'agglutination. Le deuxième groupe se base directement sur la formation du complexe Ag-Ac en utilisant un analogue marqué de la cible à doser (format compétitif) ou en utilisant un second Ac marqué (format non compétitif) en vue d'une détection ou d'un dosage.

## II.1°) Techniques basées sur la précipitation et l'agglutination des immuncomplexes

### *II.1.1°) L'immunoprécipitation*

Les techniques d'immunoprécipitation en solution ou en gel sont les premières à avoir été développées. Elles sont basées sur la formation d'un treillis moléculaire qui lie les Ag et les Ac par leurs épitopes et paratopes respectifs. Cela implique que les Ag possèdent plusieurs épitopes différents à leur surface et que l'immunsérum contient plusieurs Ac différents spécifiques de ces épitopes. Quand un Ag est mis en présence de ces Ac spécifiques, les immuncomplexes se forment rapidement et précipitent lentement. La réaction de précipitation, résultant de la liaison entre l'Ac et l'Ag, dépend des caractéristiques de cet Ag, des concentrations relatives de l'Ag et de l'Ac, de la force ionique, du pH de la solution et de la température. Une importante caractéristique de l'immunoprécipitation est illustrée sur la Figure 6A : lorsque l'on ajoute des quantités croissantes d'Ag à une quantité constante d'Ac polyclonaux correspondants, la quantité d'immuncomplexes augmente pour atteindre un maximum, avant de décroître. Cette diminution indique qu'en présence d'un excès d'Ag, une partie des immuncomplexes reste soluble. La zone d'équivalence est la zone dans laquelle les concentrations d'Ag et d'Ac sont optimales pour donner le maximum de précipité.



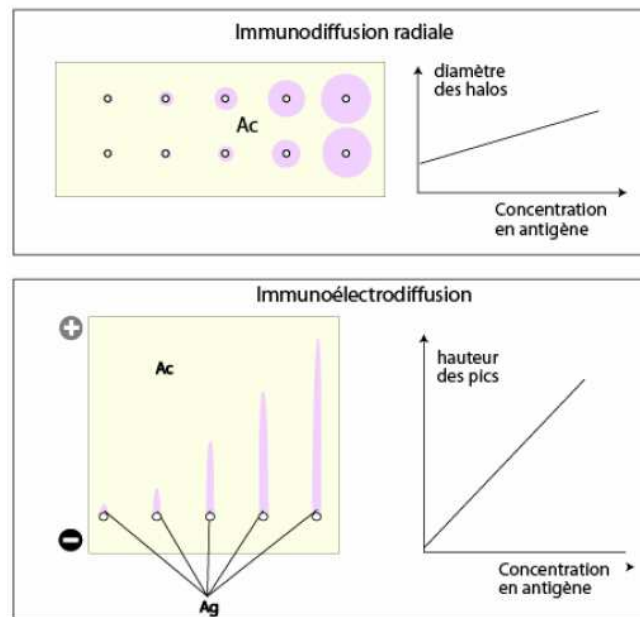


**Figure 6. A) Zone d'équivalence de la formation du complexe Ag-Ac. B) Techniques permettant de mesurer la précipitation du complexe Ag-Ac. Extrait de [1].**

L'immunoprécipitation peut s'effectuer soit en solution soit dans un gel. Le dosage basé sur l'immunoprécipitation en solution est habituellement fait par les techniques de turbidimétrie et de néphélométrie. Avec ces techniques (Figure 6B), les mesures sont faites pendant la formation précoce des immuncomplexes. Le principe employé dans cette technologie, qui requiert des solutions parfaitement transparentes, est basé sur la dispersion de la lumière passant à travers une solution opalescente (résultant de la formation de l'immuncomplexe). En turbidimétrie, l'accroissement de l'absorption de la lumière est mesuré par un détecteur placé dans l'axe de la lumière incidente, on peut utiliser pour cela des spectrophotomètres. Pour la néphélométrie, la lumière dispersée est mesurée par un détecteur (un néphélomètre) placé dans un axe formant un angle compris entre 5 et 90° avec l'axe de la lumière incidente. La sensibilité de la turbidimétrie est inférieure à celle de la néphélométrie. En effet la turbidimétrie mesure une petite différence

d'intensité lumineuse entre deux rayons d'intensité très voisine, alors que la néphélométrie mesure l'intensité de la lumière dispersée. Ces techniques sont couramment utilisées pour le dosage des protéines, particulièrement en médecine.

Les techniques effectuées en gel sont beaucoup plus vastes et proposent différentes approches. Ces techniques sont réalisées dans des gels d'agarose. Le gel est un réseau à mailles très larges dans lequel les protéines peuvent librement se déplacer. Quand les Ag et les Ac correspondants, préalablement déposés dans le gel, se trouvent en contact, un immuncomplexe se forme, puis précipite dans la région du gel où se trouvent les concentrations optimales d'Ag et d'Ac (zone d'équivalence). La diffusion, l'électrophorèse, ou les deux ont été utilisées pour amener les Ag et les Ac en contact ou pour diriger les Ag à travers un gel contenant une concentration donnée d'Ac. Cette méthode recouvre une très large variété de techniques, que l'on peut diviser en deux groupes : les Ag et les Ac sont dans des puits différents puis diffusent dans le gel (techniques qualitatives), les Ag sont déposés dans des puits et diffusent dans un gel contenant des Ac (techniques quantitatives). Les approches qualitatives développées par Ouchterlony [4] permettent de mettre en évidence la présence des Ac par apparition d'un arc de précipitation dans le gel. Les approches quantitatives (Figure 7) ont été développées quelques années plus tard. L'immunodiffusion radiale de Mancini [5] est réalisée sur un gel contenant des Ac. Les puits creusés dans le gel sont remplis avec les solutions de l'Ag de référence et celles de l'Ag à doser. Après quelques heures de diffusion dans certains cas, mais plus généralement après un à quelques jours, des halos de précipitation se forment autour des puits, dont la surface et le diamètre sont proportionnels à la concentration de l'Ag étudié. Comme pour la diffusion radiale, la technique de l'immunoélectrodifusion [6] ou immunoélectrophorèse en fusée utilise un champ électrique pour faire migrer les partenaires immunologiques. Après un certain temps d'électrophorèse (entre 6 et 16 heures, selon le champ électrique appliqué et la concentration en Ag), des pics de précipitation se forment, dont la surface et la hauteur sont proportionnelles à la quantité d'Ag déposée dans les puits. Ces techniques de précipitation sont simples d'utilisation et peu coûteuses mais se révèlent longues et peu sensibles. Elles ont donc peu à peu disparu au profit des techniques d'agglutination largement utilisées dans les laboratoires d'analyses médicales.

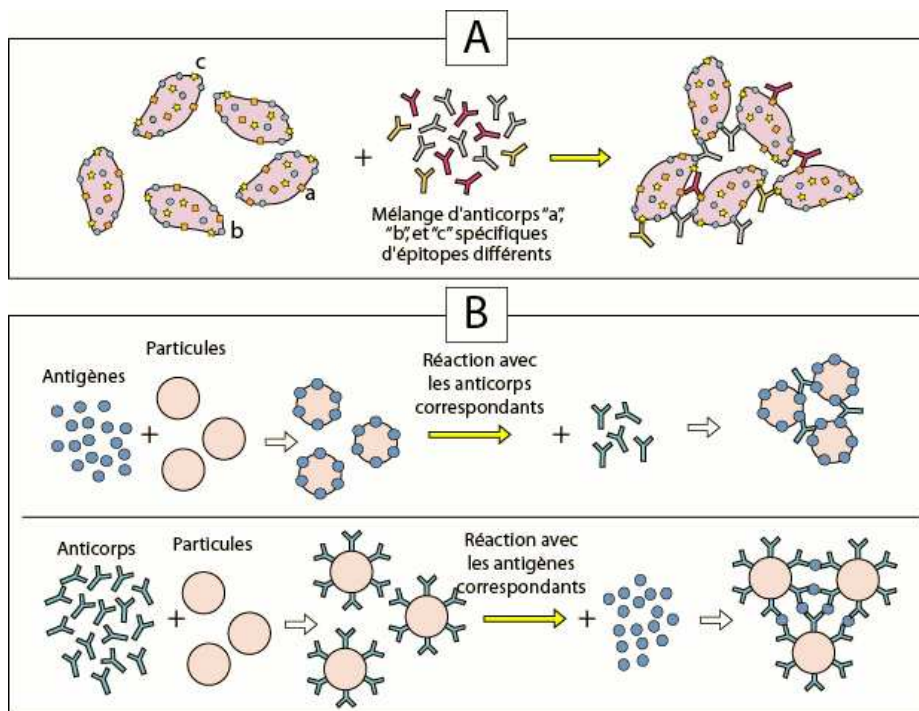


**Figure 7. Exemples d'immunoprécipitations quantitatives. Extrait de [1].**

### II.1.2°) L'immunoagglutination

Les premières techniques d'agglutination ont été effectuées en utilisant des globules rouges ou hématies et portent le nom d'hémagglutination [7, 8] (Figure 8 A). Quand les Ag sont à la surface de cellules, l'action des Ac qui s'attachent chacun par deux épitopes sur des cellules différentes aboutit à une agglutination visible. Les techniques de serotypage, c'est-à-dire la détermination du groupe sanguin, s'effectuent par hémagglutination. L'agglutination a par la suite fait appel à des particules de latex fonctionnalisées avec des Ag pour le dosage des Ac ou vice versa. Quand les particules greffées avec les Ag ou les Ac sont mises en suspension dans une solution contenant les Ac ou les Ag correspondants, des ponts se forment entre les particules, donnant une immunoagglutination (Figure 8 B). Des particules revêtues d'Ag spécifiques sont utilisées pour détecter dans le sérum de patients les Ac caractéristiques de certaines maladies. Les particules revêtues d'Ac ont un large spectre d'applications en diagnostic médical et vétérinaire, en bactériologie et en contrôle de la qualité alimentaire. L'immunoagglutination peut être observée à l'œil nu ou mesurée par turbidimétrie ou néphélométrie [9]. En ce qui concerne l'observation à l'œil nu, une goutte de chaque solution de réactif est mélangée sur une lame et des agrégats visibles apparaissent après quelques secondes ou quelques minutes. Il existe également des kits de poly-diagnostic contenant des particules de latex de différentes couleurs. La détection à l'œil nu ne

permet qu'une évaluation qualitative. Ces techniques sont très simples à utiliser et sont encore appliquées en bactériologie et en contrôle de qualité alimentaire. Pour les techniques de turbidimétrie et néphélométrie, le choix du diamètre de la particule est important. De grands diamètres (300 à 1000 nm) sont recommandés pour la détection à l'œil nu. De plus petits diamètres (moins de 100 nm) sont recommandés pour la turbidimétrie et la néphélométrie comme nous le verrons plus tard dans le chapitre concernant les nanoparticules. L'avantage de ces techniques à une étape sans nécessité de lavage est qu'elles sont simples et rapides. Elles requièrent cependant des milieux parfaitement transparents et peuvent être perturbées par des réactions non spécifiques responsables d'une agglutination parasite. Pour l'immunoagglutination passive, un point majeur consiste à trouver les conditions permettant de prévenir des agglutinations spontanées des particules qui favorisent la réaction Ag-Ac et qui évitent les réactions non spécifiques dues à la présence de certains composants dans l'échantillon. La possibilité d'application de cette technique dépend donc beaucoup du milieu dans lequel l'analyte doit être détecté ou dosé.



**Figure 8. A) Principe de l'hémagglutination et B) de l'agglutination de billes de latex. Extrait de [1].**

## II.2°) Techniques basées sur la réaction primaire entre un antigène et un anticorps

### II.2.1°) Immunoessais en phase hétérogène

Les immunoessais en phase hétérogène se déroulent à l'interface entre un support solide et la phase liquide contenant la molécule cible. La molécule de capture est immobilisée à la surface du support solide et la cible diffuse vers la surface puis réagit avec son partenaire immunologique. La plupart des immunoessais en phase hétérogène se pratiquent en utilisant des microplaques 96 puits. Ces plaques permettent d'obtenir un haut débit d'analyse et un haut niveau d'automatisation. Ces techniques en microplaques sont limitées par le transfert de masse des analytes. En effet, seule la molécule cible diffuse ce qui entraîne des temps d'analyse élevés et des limites de détection parfois faibles. Pour pallier ce problème de sensibilité, la détection doit faire appel à des molécules fluorescentes, radioactives ou issues de la réaction enzymatique. La détection à l'aide d'enzyme est probablement la plus utilisée et a donné le nom d'enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [10] dont la séquence analytique est décrite en figure 9 pour les formats compétitif et non compétitif. Brièvement, la molécule de capture est adsorbée à la surface de la plaque puis les sites non occupés sont recouverts par une molécule saturante (PVP, BSA...). L'échantillon à analyser est ensuite introduit dans le puit de la plaque. Dans le format compétitif, la molécule cible est en compétition avec un analogue marqué par une enzyme. Plus la quantité de la molécule cible à doser est importante, plus les sites de captures seront occupés par cette dernière et moins l'analogue marqué sera retenu. Le signal obtenu, donné par l'analogue marqué capturé en surface de la plaque, est inversement proportionnel à la concentration de la molécule cible. Pour le format non compétitif, la molécule cible est ajoutée sans analogue marqué puis est détectée en utilisant un Ac secondaire marqué par une enzyme et spécifique de la cible. Dans ce cas le signal est proportionnel à la concentration de l'analyte.

De façon générale, le test non compétitif est préféré au test compétitif car il est plus sensible. En effet, plusieurs Ac secondaires peuvent interagir avec une même molécule cible, ainsi l'amplification du signal est favorisée. En contrepartie, on ne peut pas utiliser l'approche non compétitive pour l'analyse des haptènes puisque ces derniers sont en général trop petits pour réagir avec deux molécules d'Ac à la fois. Les temps d'analyse en microplaque peuvent durer entre 5 et 7 heures et la limite de détection des Ac via l'ELISA se situe classiquement entre 1-10 ng/mL.

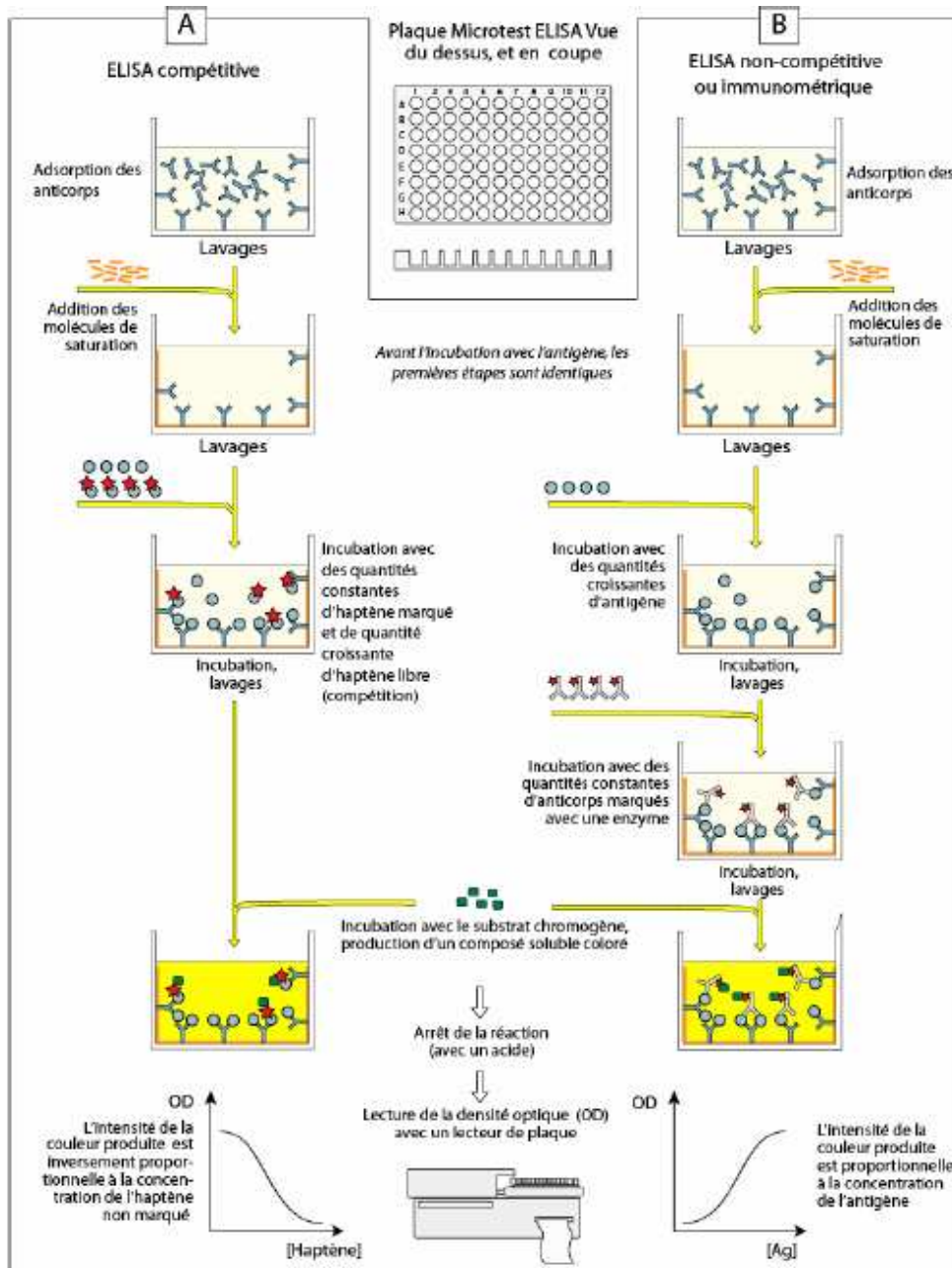
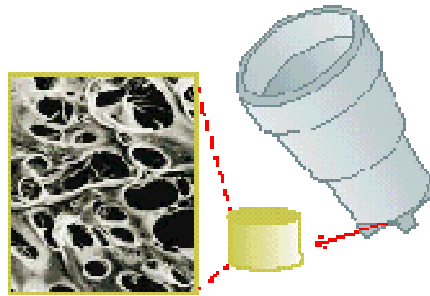


Figure 9. Séquence analytique des techniques ELISA pour le format compétitif (A) et non compétitif (B). Extrait de [1].

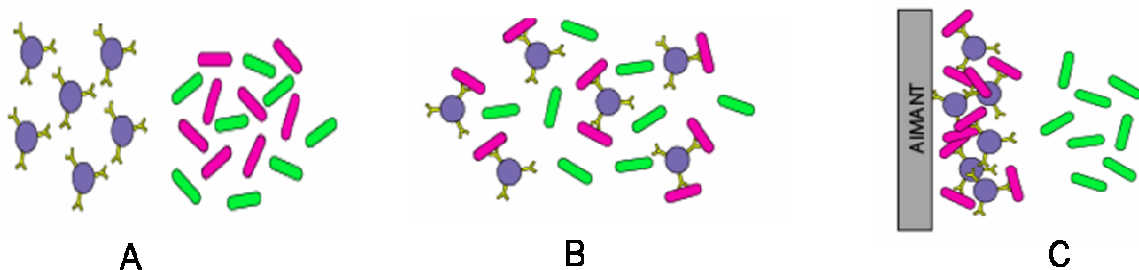
La technique Immunocap [11] ou enzyme-linked filtration assay (ELIFA) est basée sur la même procédure que l'ELISA mais le support est ici une membrane poreuse de cellulose sur laquelle la molécule de capture est greffée, la solution contenant l'analyte est par la suite percolée à travers cette membrane (Figure 10). Dans ce cas, la surface spécifique et donc la capacité de capture de la cible sont grandement améliorées. Ainsi les temps d'analyse peuvent être réduits à 2 heures et la limite de détection peut atteindre 0,5 ng/mL d'Ac. Au même titre que les microplaques,

l'immunocap est entièrement automatisable mais les consommations de réactifs restent importantes. C'est aujourd'hui l'une des techniques de référence dans les laboratoires d'analyses médicales.



**Figure 10. Schéma du system immunocap.**

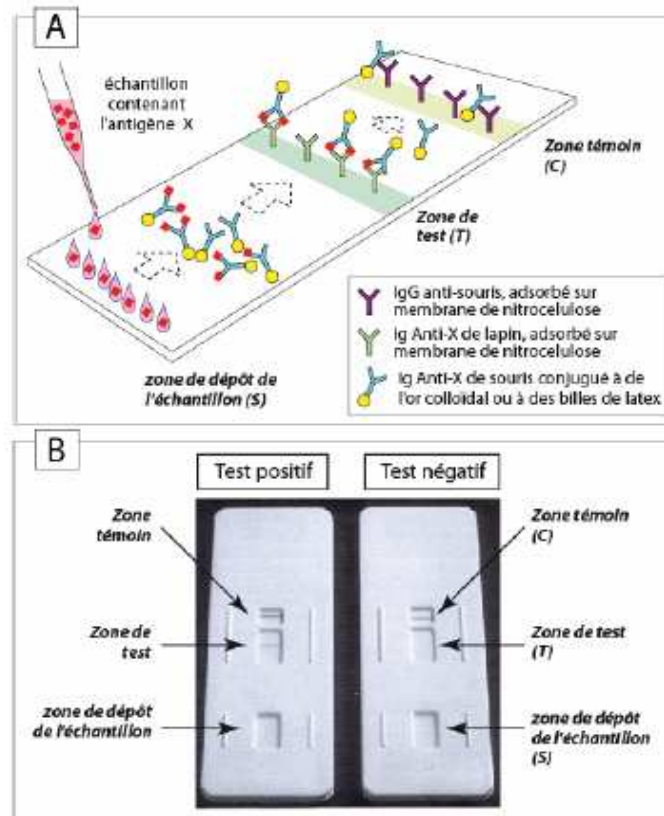
Toujours dans l'optique d'améliorer la capture de la cible, des billes magnétiques fonctionnalisées avec l'Ac de capture ont été utilisées en tant que support [12]. La taille micrométrique des billes permet la capture de l'analyte dans la totalité du volume de l'échantillon et leurs propriétés magnétiques permettent des étapes de rinçage rapides et efficaces entre chaque incubation comme schématisé sur la figure 11. La suite de la procédure analytique est identique à celle de l'ELISA. Dans ce système, la surface disponible pour l'immobilisation est considérablement augmentée en comparaison de celle des puits de microplaques et les cinétiques de capture des molécules cibles en solution sont grandement accélérées. Du fait de leur taille relativement importante, les billes magnétiques sédimentent rapidement ce qui nécessite une agitation permanente. La diffusion des billes par rapport aux analytes est négligeable, on considère ainsi que l'analyse se déroule en phase hétérogène bien que les billes soient en suspension. Dans ce contexte, le temps total de l'analyse peut être réduit à 1 heure tout en conservant la même limite de détection.



**Figure 11. Capture de l'analyte par des billes magnétiques. A) L'analyte est mélangé aux billes magnétiques fonctionnalisées avec l'Ac de capture, B) la molécule cible est capturée puis C) séparée de sa matrice par application d'un champ magnétique. Extrait de [1].**

Un autre type de support a été développé ces dernières années : les immunosticks dont il existe différentes variétés. Ce sont des outils de détection (comme les tests de grossesse) et de quantification [13-18]. Ces kits comportent une membrane avec des Ac de capture ainsi que toutes les solutions nécessaires pour faire le test d'identification (Ac marqués avec une enzyme, substrat de l'enzyme, solutions contenant les témoins positifs et négatifs). Sous l'action de l'enzyme, le substrat produira un produit coloré, soluble ou insoluble, en fonction de la modalité de visualisation. Dans le format « dipstick » la membrane est successivement trempée pendant un temps court dans la solution de l'échantillon puis dans les différentes solutions de détection. Une coloration indique la présence de l'analyte. Certains immunosticks (strip-tests) combinent la chromatographie et l'immunodétection. Dans ces tests, de l'or colloïdal rouge ou des particules de latex bleues remplacent avantageusement les enzymes pour marquer les Ac ; on économise ainsi l'étape de caractérisation de l'enzyme. Un de ces kits typiques, le lateral flow device (LFD Figure 12) comporte une membrane insérée dans une coque de plastique présentant trois fenêtres. Ces fenêtres permettent de voir ou d'avoir accès à la membrane : S (zone de dépôt de l'échantillon), T (zone de test) et C (zone témoin). Entre les fenêtres S et T, sous la coque de plastique, la membrane porte des Ac non liés, spécifiques de l'analyte, conjugués à de l'or colloïdal. Un autre échantillon des mêmes Ac est immobilisé sur la membrane en T. D'autres Ac, spécifiques des IgG (anti-IgG) de l'animal dans lequel les Ac anti-analyte ont été produits, sont immobilisés sur la membrane en C. L'échantillon est déposé dans la fenêtre S. Le liquide entraînera les Ac conjugués à l'or vers C. Si l'échantillon ne contient pas l'analyte, les Ac conjugués continueront leur course jusqu'à l'extrémité de la membrane mais seront stoppés en C par les Ac anti-IgG immobilisés. On aura alors un trait rouge (dû à l'or colloïdal) dans cette fenêtre indiquant que le témoin négatif est valide. Si l'Ag est présent dans l'échantillon déposé en S, il réagira immédiatement avec les Ac conjugués puis sera stoppé en T par les Ac immobilisés réagissant avec les autres épitopes de l'Ag déjà attachés aux Ac conjugués. Un trait rouge apparaîtra en T. Les Ac conjugués en excès continueront leur migration et seront stoppés en C : la fenêtre C fera apparaître un trait rouge, indiquant encore la validité du test. Ces outils analytiques s'affranchissent de tous les appareils de détection et la visualisation des résultats à l'œil nu permet la détection sur site.

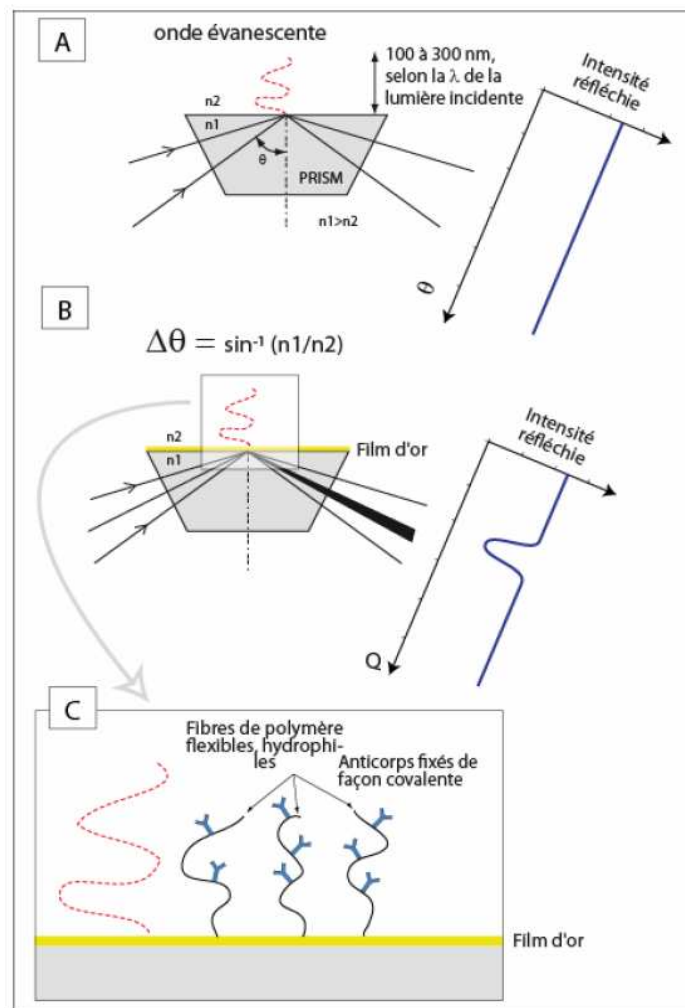




**Figure 12. Test immunochromatographique. A) Principe du test et B) un exemple de résultats. Extrait de [1].**

Toutes les précédentes techniques développées en phase hétérogène requièrent l'utilisation de molécules marquées pour l'étape de détection. Afin de s'affranchir de ce « marquage » pouvant modifier la structure des molécules et donc leurs interactions avec leurs partenaires immunologiques, des biocapteurs optiques utilisant la résonance des plasmons de surface (SPR) ont été développés durant les 20 dernières années [19, 20]. Ils sont basés sur une propriété particulière de la lumière qui, lorsqu'elle pénètre dans un prisme dans des conditions de réflexion totale, génère une « onde évanescente » à la surface de ce prisme (Figure 13). Sur cette surface, le dispositif comprend une « structure de résonance » (le plus souvent une fine feuille d'or). Pour un certain angle de la lumière incidente, une partie de l'énergie est capturée à cause de la résonance avec la surface d'or ce qui peut conduire éventuellement à une perte de l'intensité de la lumière réfléchi. Ce phénomène dépend en particulier de l'indice de réfraction à la surface du prisme. Cet indice de réfraction est modifié par l'état de surface du prisme lié à la présence ou à l'absence des analytes. Si toutes les conditions de l'expérience, à l'exception de l'indice de réfraction, restent identiques, une modification de cet indice induira un changement de l'angle de la lumière réfléchi.

Les dispositifs existants permettent de mesurer cette variation de l'angle et donc les variations de quantités d'un composant donné capturé spécifiquement dans une micro-cuve à la surface du prisme. Ils peuvent être utilisés pour mesurer des réactions biologiques, incluant des investigations sur la reconnaissance moléculaire, l'affinité, la cinétique, la concentration en temps réel, et tout ceci sans avoir besoin de marqueurs (label free). Cette technique peut être effectuée au format compétitif et non compétitif [21], mais souffre d'une sensibilité plus faible (10 ng/mL) par rapport aux techniques citées plus haut.



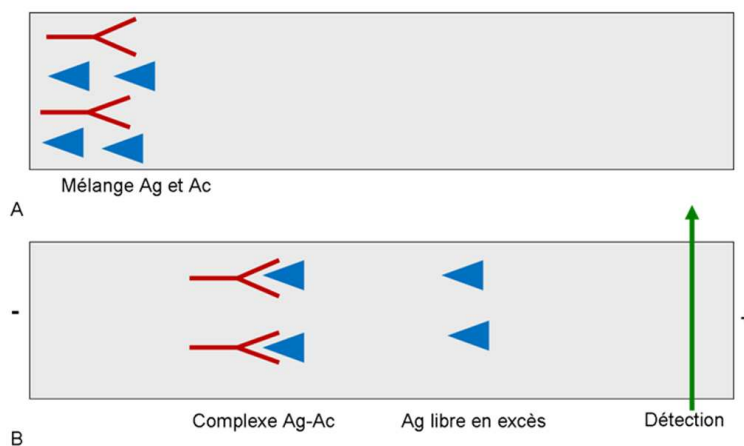
**Figure 13. Principe des biocapteurs optiques. Extrait de [1].** A) Angle de lumière incidente permettant une réflexion totale. B) Pour un angle incident donné dépendant du rapport entre l'indice de réfraction du prisme et au dessus du prisme intervient une résonance qui consomme une part de l'énergie lumineuse. C) Des Ac sont fixés sur des fibres de polymères flexibles hydrophiles elles mêmes fixées à la surface de la couche d'or. La liaison Ag-Ac augmente l'indice de réfraction au dessus du prisme modifiant ainsi l'angle de réfraction de la lumière.

L'approche en phase hétérogène permet de capturer les analytes à la surface d'un support solide ce qui assure une séparation facile des complexes et des formes libres ainsi qu'une préconcentration de la cible avant sa quantification mais est limitée par le transfert de masse des analytes ce qui augmente les temps d'analyse. Ces derniers sont diminués pour les immunoessais en phase homogène.

### II.2.2°) Immunoessais en phase homogène

Contrairement aux immunoessais en phase hétérogène, la phase homogène permet aux deux acteurs de la réaction immunologique de diffuser librement en solution. La plupart de ces essais se font avec des molécules non marquées, ainsi l'affinité des partenaires immunologiques ne risque pas d'être altérée par une modification de la conformation des biomolécules. La première étape consiste en la réaction entre la molécule cible et son partenaire immunologique en solution, ainsi les distances de diffusion par rapport aux précédents formats sont réduites et la cinétique d'interaction accélérée. Une fois la réaction terminée, la détection peut s'effectuer de différentes façons.

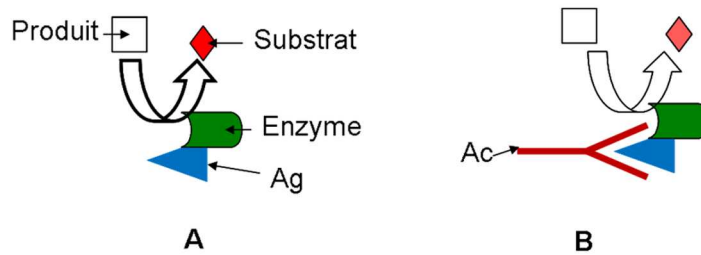
La première approche largement développée est basée sur la séparation du complexe et des formes libres n'ayant pas interagi avant la quantification. L'étape de séparation schématisée figure 14 s'effectue le plus souvent en électrophorèse capillaire (EC) de zone (ECZ) [22-27].



**Figure 14. Immunoessai en phase homogène en ECZ. A) interaction entre l'Ag et l'Ac en l'absence de champ électrique. B) Application du champ électrique et séparation du complexe et des formes libres.**

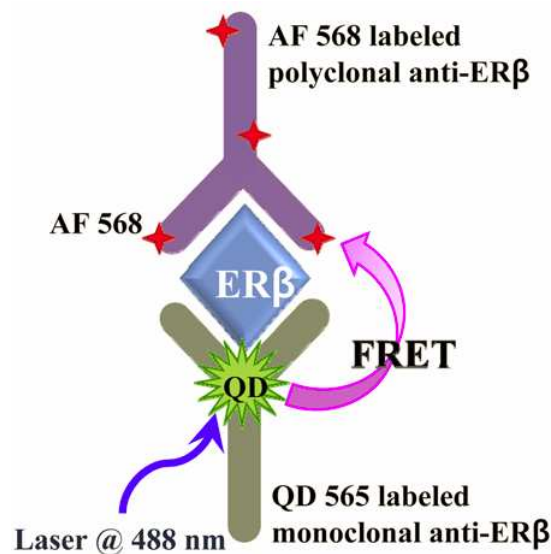
Sous l'action d'un champ électrique, le complexe Ac-Ag peut être séparé des formes libres en fonction de leur différence de mobilité électrophorétique elle-même reliée au rapport charge/rayon hydrodynamique. La quantité de complexe est proportionnelle à la quantité de la molécule que l'on veut doser (l'Ac dans l'exemple). La détection peut être plus sensible en marquant l'un des deux partenaires immunologiques à une molécule fluorescente, mais cela nécessite un système de détection adéquat et plus coûteux que la détection UV. Les limitations de cette approche en ECZ sont nombreuses. L'un des inconvénients est lié à l'adsorption non spécifique des molécules à la surface du capillaire. Ce type de séparation requiert donc un traitement de surface drastique pour effectuer des analyses quantitatives. Les immunoessais en EC offrent un degré d'automatisation élevé ainsi que des consommations d'échantillons très faibles de l'ordre du nanolitre. Le temps total d'analyse est réduit par rapport au format hétérogène mais la sensibilité est également réduite d'un ordre de grandeur environ par rapport à l'ELISA en microplaque.

D'autres techniques ont été élaborées pour s'affranchir des étapes de séparation. Ainsi une autre approche des immunoessais en phase homogène consiste à mettre en solution des Ag marqués avec une enzyme (Ag-E). Si l'Ac que l'on veut doser est présent en solution, il va interagir avec l'Ag-E. Cette interaction peut engendrer une modification de la conformation de l'enzyme et va limiter l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme (Figure 15). Ainsi, la formation du complexe immunologique diminue les propriétés catalytiques de l'enzyme qui en présence de son substrat donnera un signal plus faible comparativement à l'Ag-E libre. La diminution du signal sera proportionnelle à la concentration en Ac. D'autres approches basées sur un format compétitif ont également vues le jour [28, 29]. L'avantage de ce système est que la procédure analytique ne requiert pas d'étapes de rinçage et de séparation. En contrepartie, la réponse de l'enzyme à la formation du complexe Ag-Ac n'est pas radicale, il ne s'agit pas d'une activation ou d'une désactivation totale de l'enzyme mais seulement d'une modification de son activité, ce qui fait que la valeur du témoin négatif dans certains cas reste élevée.



**Figure 15. Immunoessai en phase homogène. A) En l'absence d'Ac à doser, l'activité de l'enzyme est maximale. B) En présence de l'Ac à doser, la formation du complexe diminue, l'activité de l'enzyme et la transformation du substrat en produit coloré est ralentit.**

Toujours dans l'optique de simplifier et raccourcir la procédure analytique, la technique de transfert d'énergie de fluorescence ou FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer est une technique vieille de plus d'un demi-siècle qui connaît actuellement un regain d'intérêt. Le FRET [30] est un transfert d'énergie d'une molécule donneuse vers une molécule acceptrice, ce transfert résultant généralement en une émission de fluorescence de la molécule acceptrice.



**Figure 16. Schéma d'un immunoessai utilisant le FRET.**

L'excitation d'un premier fluorophore sous la forme d'une molécule ou d'un quantum dots (QD) résulte en une émission de fluorescence de celui-ci à moins qu'il ne se trouve à proximité d'un

fluorophore accepteur dû à la formation du complexe Ag-Ac ; un transfert d'énergie de fluorescence du donneur vers l'accepteur résultera dès lors en une diminution du signal de fluorescence du donneur et en une augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur. Dans l'exemple de la figure 16, deux Ac spécifiques d'un même Ag sont marqués chacun par un QD (donneur) et un fluorophore (accepteur). En l'absence d'Ag dans l'échantillon, l'excitation du QD permet l'émission de fluorescence et un signal spécifique de ce dernier est mesuré. Dès que l'Ag est présent en solution, il y a formation du sandwich ce qui rapproche les deux Ac, si le QD est excité, l'émission de fluorescence qui en résulte est absorbée par le fluorophore accepteur du second Ac. Ainsi la concentration en Ag est inversement proportionnelle à la fluorescence du donneur. L'approche par bioluminescence est également envisageable et porte le nom de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert) [31]. Elle est basée sur le même principe que le FRET. Ici l'émission de rayonnement ne se fait pas par excitation lumineuse mais résulte d'une complexation ou d'une réaction chimique, le signal de base est donc extrêmement faible ce qui améliore le ratio signal/bruit. De plus, la procédure est ici aussi simplifiée car les étapes de lavage et de séparation ne sont pas nécessaires. La qualité du transfert dépendra de différents paramètres parmi lesquels le recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur d'une part et la distance entre les fluorophores considérés d'autre part.

Les immunoessais en phase homogène favorisent les cinétiques d'interaction des partenaires immuns et le temps d'analyse est réduit. L'absence de support solide limite les interactions non spécifiques mais cette approche ne permet pas de préconcentrer l'analyte avant la détection de ce dernier, il en résulte une sensibilité plus faible qu'en phase hétérogène. Des approches développées à l'échelle du microsystème ont permis d'améliorer cette sensibilité comme nous le verrons plus loin.

### II.3°) Les tests de diagnostic de l'allergie

L'établissement du diagnostic de l'allergie et l'implication d'un allergène précis étant difficiles, la démarche diagnostique doit comporter différentes étapes afin de déterminer l'origine allergique des symptômes d'un patient et d'identifier le ou les allergènes en cause [32]. L'étape clinique comprend tout d'abord un interrogatoire, un examen clinique voire une enquête alimentaire. Dans la majorité des cas, les incertitudes liées aux manifestations et à la rencontre avec l'aliment rendent nécessaires

l'utilisation de tests complémentaires aux premières investigations cliniques. Il s'agit de l'étape biologique qui inclut des tests *in vivo* et des tests *in vitro*.

### II.3.1°) Les tests *in vivo*

Nous n'aborderons cet aspect que très brièvement car il ne s'intègre pas directement dans la thématique de l'étude. Les principaux tests *in vivo* sont les tests cutanés, la technique des prick-tests est la méthode la plus fréquemment utilisée. Elle est recommandée pour sa simplicité, sa sûreté et son caractère indolore. Elle consiste à piquer l'épiderme à l'aide d'aiguilles spéciales au travers d'une goutte d'un extrait allergénique, préalablement déposée sur la peau. Les prick-tests sont réalisables dès les premiers jours de la vie sous réserve que la peau réagisse aux témoins positifs (le phosphate de codéine provoque une dégranulation non spécifique des mastocytes). Cela permet de vérifier que la peau comporte des mastocytes aptes à réagir. La lecture a lieu au bout de 15 minutes, la réaction est positive si le diamètre de l'induration est d'au moins 3 mm et/ou supérieur de 50% à celui du témoin positif. Ce type de test est sensible cependant, l'intensité des réactions cutanées obtenues n'est pas bien corrélée à la symptomatologie observée lors des tests de provocation.

L'autre approche et le test par voie orale. La place du test de provocation par voie orale est capitale en allergologie alimentaire. Il reproduit l'histoire clinique en respectant le temps, la quantité des aliments et les symptômes. Ces informations évaluent le risque encouru lors de la consommation accidentelle de l'aliment et fournissent des renseignements sur les mesures à prendre. Le test de provocation par voie orale est potentiellement dangereux. Il est donc impérativement réalisé au sein d'une structure capable de traiter rapidement une anaphylaxie, sous la surveillance spécialisée du personnel médical. Il est évidemment contre-indiqué pour des raisons éthiques, si l'allergie alimentaire s'est révélée par une anaphylaxie aigüe.

### III.3.2°) Les tests *in vitro*

L'étude clinique peut être confortée par des tests *in vitro* qui tentent de traduire objectivement, par la mesure d'un paramètre sur un échantillon biologique humain, l'état allergique du patient. Ces

tests biologiques, sans risques pour le patient, permettent d'incriminer un allergène particulier au sein d'un aliment. Différents tests biologiques sont utilisés :

- le dosage des IgE spécifiques.
- les immunoempreintes : elles permettent d'établir la reconnaissance par les IgE spécifiques de protéines séparées par électrophorèse en gel.
- le test d'histamino-libération et de dégranulation des basophiles : il permet d'évaluer le potentiel déclenchant de l'allergène et mettent ainsi en évidence la libération de médiateurs, notamment l'histamine, au contact des allergènes.

Le dosage des IgE dans les laboratoires d'analyses médicales ou en recherche est effectué par des techniques ELISA en microplaques ou en ImmunoCap décrit précédemment. Les taux d'IgE mesurés sont exprimés en  $\text{kU}\cdot\text{ml}^{-1}$  ou  $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  selon le produit commercial utilisé. La technique de dosage des IgE sériques spécifiques, reconnue comme la référence, est celle du Cap System® de Phadia. Les résultats sont exprimés en  $\text{kU}\cdot\text{ml}^{-1}$  : le seuil de détection est fixé à  $0,35 \text{ kU}\cdot\text{ml}^{-1}$  soit environ  $0,7 \text{ ng/mL}$  d'Ac.

Pour l'immunoempreinte, les protéines de la source allergénique sont tout d'abord séparées par électrophorèse mono ou bidimensionnelle sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose selon deux caractéristiques physico-chimiques : leur point isoélectrique et leur masse moléculaire. Les protéines sont ensuite soit transférées passivement soit électro-transférées sur une membrane (Western-blot). La membrane peut alors être incubée avec le sérum du patient et ses IgE se fixent spécifiquement sur les protéines auxquelles il est allergique. Cette technique permet d'incriminer un ou plusieurs allergènes au sein d'une source allergénique complexe responsable des symptômes [33]. D'autre part, elle permet également de visualiser les isoformes des protéines analysées non accessibles en ELISA. Les analyses par immunoempreintes sont qualitatives et quantitatives grâce à l'utilisation de densitomètres.

La dernière approche consiste à mesurer l'histamine libérée lorsque les basophiles du patient sont mis en contact avec l'allergène incriminé. Ce test *in vitro*, ou plutôt *ex vivo* en ce qui concerne les cellules est probablement le plus révélateur car comme dit précédemment, les symptômes cliniques sont le fruit de la libération de l'histamine par les mastocytes et les basophiles lorsque ces derniers interagissent avec les complexes IgE-allergènes. Or cette libération dépend de différents facteurs



comme la nature de l'Ag, la concentration en IgE ou encore le nombre de récepteurs aux IgE à la surface du basophile. La quantification des IgE déterminée par ELISA permet d'indiquer la présence ou non d'une IgE circulante dans le sérum du patient mais ne permet pas de dire si cette concentration en IgE va engendrer la libération d'histamine. Le seul test *in vitro* permettant de répondre à cette question est le test d'histamino-libération.

L'ensemble des techniques présentées ici se déroulent à l'échelle macroscopique, ces techniques sont pour la plupart longues (plusieurs heures voire plusieurs jours) et consomment beaucoup d'échantillons (plusieurs centaines de  $\mu\text{L}$ ) souvent coûteux. La réduction des dimensions du système analytique à l'échelle micrométrique devrait permettre de s'affranchir de ces contraintes.

### **III) Intégration des immunoessais à l'échelle du microsysteme**

#### III.1°) Les microsystemes et les techniques de microfabrication

##### *III.1.1°) Présentation des microsystemes*

La microfluidique peut se définir comme étant la discipline portant sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des systèmes dont au moins l'une des dimensions est micrométrique. Cette définition est aujourd'hui insuffisante pour couvrir l'ensemble des activités de recherches désignées par le terme "microfluidique", qui peut comprendre entre autres l'étude de phénomènes physiques, des développements de la chimie analytique ou encore des études de biologie moléculaire. Cette diversité d'applications explique l'engouement actuel pour ce domaine de recherche. En effet, l'intégration de l'ensemble des processus analytiques, physiques, biologiques ou encore biochimiques au sein de ces laboratoires sur puce permet de réduire les coûts d'analyses, mais permet également le haut débit d'analyses en parallèle ainsi qu'un haut degré d'automatisation. L'échelle micrométrique permet elle de réduire les distances de diffusion des molécules et donc les temps d'analyse. Le premier microsysteme à base de silicium datant de 1975 est un chromatographe en phase gazeuse permettant l'analyse de l'air [34]. La séparation des composés s'effectuait en quelques secondes. Ces travaux ont ouvert la voie au développement des supports miniaturisés. Il a ensuite fallu attendre plusieurs années pour assister à un réel développement de la microfluidique. Ce délai peut s'expliquer non seulement par la technicité nécessaire à la fabrication des microsystemes, mais aussi par les cloisonnements existant entre communautés scientifiques. Ce n'est ainsi qu'à partir de 1991 que la miniaturisation connût un

développement continu, notamment grâce aux travaux réalisés par Manz, Harrison ou encore Ramsey [35-37].

L'architecture du microsystème, extrêmement modulable, est pensée en fonction du type d'application. Etudier un tissu, une cellule ou une réaction chimique ne requiert pas les mêmes microstructures. Les techniques de microfabrication, que nous allons maintenant aborder brièvement, offrent une grande flexibilité en termes d'architecture.

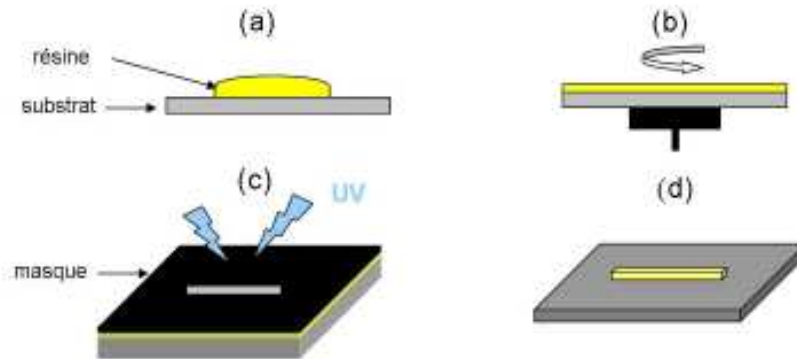
### *III.1.2°) Les techniques de microfabrication*

Les approches les plus courantes pour la fabrication de systèmes analytiques miniaturisés dépendent du matériel utilisé : verre, silicium ou polymères. La fabrication des premiers microsystèmes a tout d'abord été réalisée en verre et en silicium, les techniques de fabrication de ces matériaux ayant été bien développées pour la microélectronique. Les techniques de gravures sur verre ou silicium sont dites "dures". La gravure s'effectue à l'aide d'une attaque chimique ou physique du substrat à des endroits déterminés par une étape préalable de photolithographie. Néanmoins, les processus de fabrication sont longs et nécessitent l'accès à des installations spécifiques lors de chaque réalisation. Ces matériaux sont également chers et fragiles. Tous ces inconvénients ont poussé les groupes de recherche, dont le pionnier est celui de Whitesides [38], à investir l'utilisation de techniques dites « douces » permettant de réaliser des structures dans des élastomères ou des plastiques. Ce domaine étant extrêmement riche et les innovations y étant permanentes, des revues sont régulièrement publiées pour rapporter les avancées obtenues [39, 40]. Nous survolerons ici les principes de la microfabrication dite douce que nous avons utilisés lors de notre projet.

La fabrication des microsystèmes faisant appel aux technologies douces comprend deux étapes successives : la fabrication d'un master, empreinte négative du canal, suivie du moulage de la puce avec un élastomère.

Le master constitue le négatif du canal, il s'agit d'un substrat (verre ou silicium en général) sur lequel un motif est imprimé par photolithographie. Une résine photosensible est étalée sur un substrat plan de manière homogène grâce à un spin-coater. La résine peut être ensuite exposée à des radiations UV à travers un masque qui contient les motifs désirés. Après cuisson, le substrat recouvert de résine est développé. Deux principes existent en fonction du type de résine : pour une résine négative, la partie non insolée se dissout au contact de la solution de développement, pour

une résine positive, la partie non insolée polymérise et devient résistante au développeur. Les différentes étapes de formation d'un master sont représentées dans la figure 17.



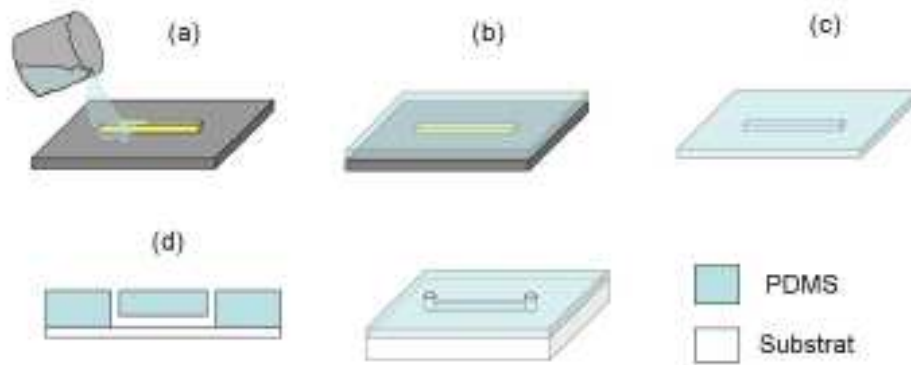
**Figure 17. Fabrication d'un master par photolithographie, cas d'une résine négative.** *a) Dépôt d'une goutte de résine photosensible sur un substrat. b) Etalement de la résine à l'aide d'un spin-coater. c) Insolation du substrat à travers un masque optique. d) Après développement, on obtient le master.*

Le master ainsi fabriqué, on va pouvoir procéder à la deuxième étape qui concerne le moulage de la puce. Il existe plusieurs techniques pour répliquer un master sur une surface polymérique. Citons notamment les techniques de hot embossing, d'injection molding pour l'utilisation de matériaux thermoplastiques ou encore de moulage simple pour les élastomères. La technique détaillée ici est celle que nous avons utilisée pour fabriquer nos microsystemes. L'un des élastomères les plus utilisés en lithographie douce est le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.

Propriété	Caractéristiques
Densité	Environ 0,9
Optique	Transparent, entre ~ 300 nm et 2200 nm
Electrique	Isolant, champ de rupture 20 kV/cm
Mécanique	Elastomérique, module de Young ~ 750 kPa
Thermique	Isolant, conductivité thermique ~ 0,2 W/m/K
Interfaciale	Basse énergie de surface (~ 20 mN/m)
Perméabilité	Perméable aux gaz, aux solvants organiques apolaires, imperméable à l'eau
Réactivité	Inerte, oxydable par plasma
Toxicité	Non toxique

**Tableau 3. Principales propriétés physico-chimiques du PDMS. Adapté de [41].**

Le PDMS est un élastomère très intéressant car il permet la réalisation aisée et rapide de microsystemes. Du fait de son élasticité, il se déforme pour des pressions supérieures à quelques centaines de millibars. Cependant, il est perméable à de nombreux solvants. Aussi, en fonction du composé organique percolé, une puce peut avoir des durées de vie variables : de quelques heures pour des solvants tels que les huiles alcanes ou silicone, à quelques secondes lorsque de l'acétone est introduite par exemple. Le master va permettre de fabriquer un grand nombre de puces tant qu'il n'est pas usé. Un mélange de monomère et de réticulant, dans les proportions 10/1 en masse, va être coulé sur le master. La réticulation du PDMS s'effectue à 65°C pendant 2 heures, le PDMS polymérise, réticule et devient ainsi solide. Après démoulage, on obtient une structure représentant le négatif du moule. On perce alors dans le répliquât ainsi formé des trous pour les connectiques à l'aide d'un poinçon. Il suffit enfin de recouvrir la structure par un substrat (lamelle de verre ou substrat préalablement recouvert de PDMS), de manière étanche pour obtenir des canaux fluidiques. Ce collage est obtenu en oxydant les deux surfaces au plasma-cleaner, ce qui a pour conséquence de former des liaisons covalentes de type siloxane entre les deux structures. Enfin, les connectiques sont ajoutées en insérant des tubes de diamètre approprié dans les trous préalablement formés. Le faible module élastique du PDMS permet de créer ainsi un joint étanche. La figure 18 résume les différentes étapes de moulage d'une puce en PDMS. A noter que la dureté finale du PDMS varie avec le temps de réticulation, la proportion de réticulant et le type de PDMS.



**Figure 18. Moulage d'une puce en PDMS.** *a) Injection du mélange monomère-agent réticulant sur le master. b) Le mélange est mis à réticuler à 65°C. c) Après réticulation, la réplique du canal en PDMS est démoulée. d) Après connexion avec le monde extérieur, la réplique est scellée à une lamelle de verre.*

La transposition des processus physico-chimiques, biologiques et biochimiques à l'échelle micrométrique n'est pas sans conséquences et apporte son lot d'avantages et d'inconvénients.

L'écoulement des fluides au sein d'un système microfluidique est de type laminaire. Le calcul du nombre de Reynolds ( $Re$ ), compare les effets inertiels et visqueux :

$$Re = \frac{\rho r v}{\eta}$$

où  $\rho$  et  $\eta$  représentent respectivement la masse volumique et la viscosité du fluide.  $v$  et  $r$  sont une vitesse et une taille caractéristique du canal.

Ce nombre est très petit devant 1 et varie généralement de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  dans les systèmes microfluidiques. A ces échelles, la gravité est négligeable et les effets visqueux prennent le pas sur les effets inertiels. Par conséquent, les écoulements sont laminaires sans aucune présence de turbulence (régime transitoire à partir de  $Re = 50$  et régime turbulent pour  $Re = 2000$ ).

Ainsi, si deux liquides sont injectés en parallèle, le mélange entre ces deux liquides ne peut être que diffusif. Ce phénomène peut être exploité pour déterminer des propriétés physico-chimiques d'un liquide (viscosité, pH...). En revanche, pour des études cinétiques ou pour des applications de dosages comme les immunoessais, l'écoulement laminaire est un problème car l'interaction entre les espèces réactives est trop lente. Afin d'améliorer l'interaction entre les espèces, les fluides doivent être mélangés de façon efficace, pour cela les fluides peuvent subir des perturbations passives où l'architecture du système (chevrons dissymétriques au sol par exemple) va entraîner le

mélange des flux laminaires. Ce mélange peut également être induit par perturbation active mécanique ou électrique.

Comme dit précédemment, la réduction des systèmes permet de réduire les distances de diffusion et d'améliorer les cinétiques d'interactions. En effet, les temps de diffusion ( $t$ ) des molécules dépendent de leur coefficient de diffusion ( $D$ ) et de la distance ( $l$ ) sur laquelle s'effectue cette diffusion comme le montre l'équation d'Einstein :

$$t = l^2 / D$$

Dans certains cas, notamment dans le domaine analytique, réduire les dimensions du système analytique permet de réduire les distances à parcourir pour chaque molécule et permet donc de réduire les temps d'analyse.

L'échelle micrométrique permet également de réduire la consommation des échantillons et autres réactifs à l'échelle du micro/nanolitre. Enfin, les techniques de microfabrication permettent d'intégrer de multiples éléments assurant ainsi la mise en place de la totalité des processus analytiques comme nous le verrons plus loin.

En contre partie, le grand rapport surface sur volume des microsystèmes favorise les adsorptions non spécifiques et l'utilisation du silicium, du verre et autre PDMS nécessite l'utilisation de traitements de surface. Ainsi diverses stratégies ont été élaborées avec par exemples des greffages dynamiques ou permanents à l'aide de petites molécules ou de polymères [42-44].

### III.2°) Transposition des immunoessais au format microsystèmes

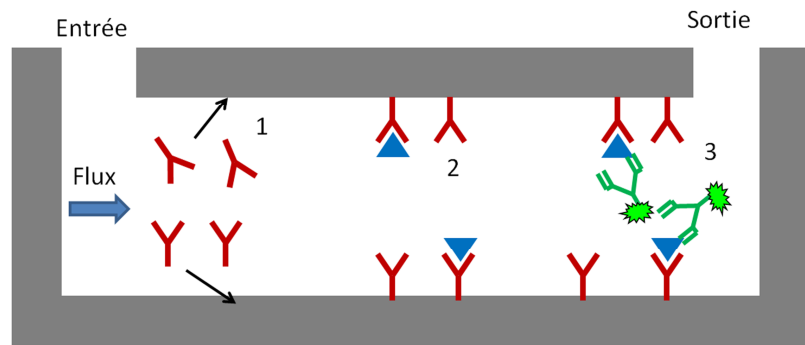
Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différentes approches pour détecter et quantifier des Ag ou des Ac. La transposition des immunoessais à l'échelle du microsystème permet d'obtenir des analyses rapides et peu consommatrices de réactifs. Les approches que nous décrirons dans cette partie sont identiques à celles décrites précédemment, l'originalité des microsystèmes ne réside pas dans le développement de nouvelles techniques mais dans l'élaboration de nouveaux supports rendant les précédentes techniques plus performantes. Nous décrirons ainsi un ensemble de supports variés, plus ou moins sophistiqués apportant tous leurs avantages et leurs inconvénients. Nous avons ici décidé d'aborder cette partie en traitant tout d'abord les immunoessais en phase hétérogène puis en phase homogène. Les techniques de précipitation ou d'agglutination au sein des

microsystèmes sont pratiquement inexistantes comparées à la multitude d'immunoessais basés sur des techniques telles que l'ELISA ou l'électrophorèse d'immunoaffinité.

### *III.2.1°) Immunoessais en phase hétérogène à l'échelle microfluidique*

Les immunoessais en phase hétérogène sont sans conteste les immunoessais les plus développés à l'échelle du microsystème. La flexibilité liée à la microfabrication a permis le développement de microstructures originales et variées.

L'approche la plus simple est l'ELISA à la surface du microcanal [45, 46] comme montrée figure 19. Cette approche consiste à adsorber la molécule de capture sur la surface du microcanal. L'échantillon contenant la molécule d'intérêt est ensuite injecté dans le microcanal suivi de l'Ac de détection. Chaque incubation dure environ 15-30 minutes pour obtenir des sensibilités comparables à celles des microplaques. La détection classique est de type colorimétrique, fluorescente ou électrochimique. Les détections optiques, largement répandues, se font à l'aide d'un microscope relié à une lampe à mercure ou un laser et à un système de détection (une camera CCD par exemple). L'injection des différents réactifs se fait à l'aide de seringues, presses seringues ou autres contrôleurs de pressions. Ces derniers permettent de limiter l'inertie des fluides au sein du microsystème observée avec des presses seringues classiques. Tous ces éléments reliés à la puce, encombrants et coûteux ont inversé la tendance du *lab on chip* en *chip on the lab*. En effet, la quasi-totalité des applications en microsystèmes ne peuvent s'affranchir de tout cet appareillage et les analyses sur site ou au chevet du patient sont encore rares comme nous le verrons plus loin. Le rapport surface/volume par rapport à une microplaque est augmenté d'un facteur 100 environ et les distances de diffusion sont également réduites ce qui améliore l'efficacité de capture de la molécule cible, ainsi le temps total d'analyse peut être réduit d'un facteur 10.

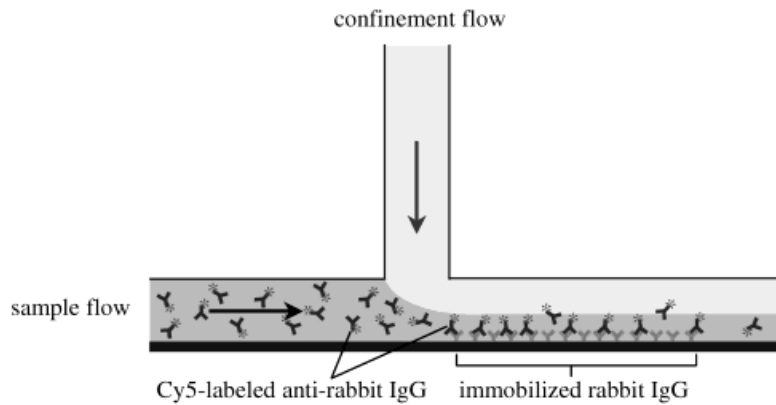


**Figure 19. Immunoessai en phase hétérogène à la surface d'un microcanal. (1) : Adsorption de l'anticorps de capture. (2) Capture de la molécule cible. (3) Injection de l'anticorps marqué et détection.**

Malgré la réduction des dimensions, les immunoessais de surface restent encore limités par le transfert de masse. Différentes approches ont donc été développées pour favoriser la capture des analytes à la surface du canal.

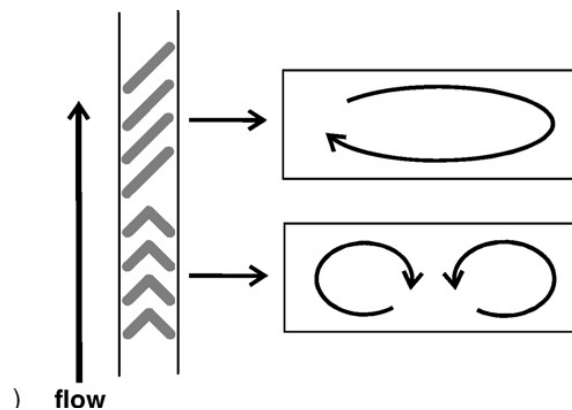
La première est basée sur le confinement des fluides contenant l'analyte [47]. En effet, en utilisant les propriétés des flux laminaires, il est possible de confiner un liquide (sample flow) en injectant perpendiculairement au canal un flux de confinement (Figure 20). Dans les conditions laminaires, les deux fluides ne se mélangent pas et l'échantillon est confiné sous la forme d'un film très fin contre la paroi du capillaire et sa vitesse d'écoulement est accélérée. Ainsi, pour un débit donné, le transport de masse est amélioré car les distances de diffusion sont réduites. Le degré de confinement dépend du débit d'injection du fluide de confinement. Ainsi, l'analyse totale peut être réduite de 55 minutes (lorsque le débit est nul) à 12 minutes. La quantité d'échantillon consommé est également réduite d'un facteur 20. En revanche, la capture de la cible n'est pas homogène sur la zone de capture, elle est importante en début de zone et diminue vers la fin. Cela est dû à une perte de la cible par diffusion dans le flux de confinement.





**Figure 20. Schéma montrant le confinement du fluide contenant l'analyte contre la paroi du canal par un fluide de confinement injecté perpendiculairement au canal. Extrait de [47].**

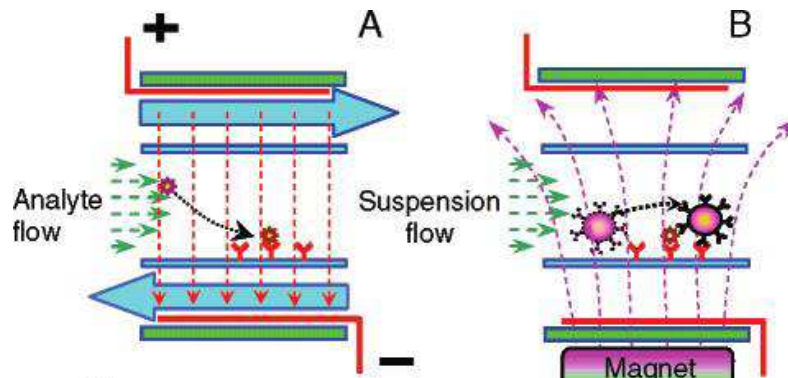
Une autre approche, à l'opposé de la précédente, consiste à casser le régime laminaire pour obtenir un régime turbulent et ainsi favoriser le mélange des fluides en utilisant par exemple le mélangeur chaotique développé par Stroock [48] où des chevrons microfabriqués à la base du canal créent une résistance au flux et entraînent une recirculation en boucle des fluides [49]. Ainsi, la cible à capturer est redirigée de la solution vers la surface du canal où se trouve la zone de capture (Figure 21). La présence de ce mélangeur permet d'augmenter de 45% l'efficacité de capture de la cible par rapport à un canal classique.



**Figure 21. Schéma montrant la recirculation des flux sur une section du canal pour deux types de chevrons. Extrait de [49].**

Toujours dans l'optique d'améliorer la capture de la cible, cette dernière peut être forcée à se diriger vers la zone de capture. L'exemple de la figure 22 montre que l'application d'un champ électrique

perpendiculaire au canal permet de faire migrer la cible vers la zone de capture [50]. L'efficacité de capture dépend alors du débit appliqué, si ce dernier augmente l'efficacité de capture diminue. La détection s'effectue à l'aide de billes magnétiques marquées par une sonde qui sont à leur tour concentrées à la surface du canal par un champ magnétique. Cette approche permet de diminuer le temps d'analyse à 4 minutes et d'obtenir une bonne limite de détection lors de la quantification d'Ac ou de virus dans le sérum du patient. Cette technique se limite néanmoins à l'analyse d'espèces chargées.

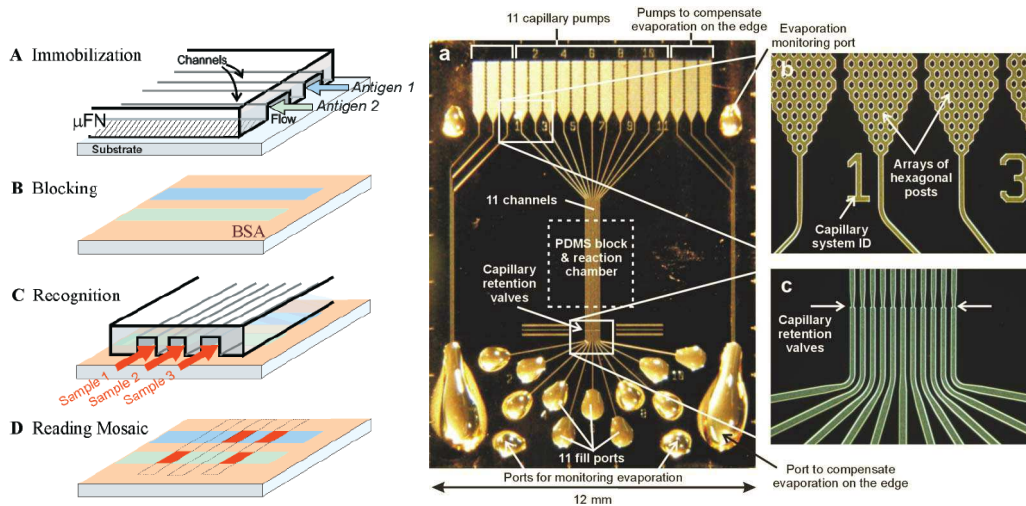


**Figure 22. (A) Schéma de la capture électrophorétique de la cible par une zone d'Ac de capture greffés sur une membrane poreuse. Le champ électrique (flèches rouges) est formé entre les électrodes (barres rouges). (B) Etape de détection par des billes magnétiques attirées à la surface de la zone de capture par un aimant. Extrait de [50].**

La rapidité d'analyse et la réduction de la consommation d'échantillons ne sont plus les seuls facteurs prépondérants pour le diagnostic, la complexité des pathologies demande de plus en plus le dosage de plusieurs biomarqueurs lors d'une unique analyse, on parle alors de multiplexage.

Ainsi, le groupe de Delamarche a proposé une plateforme sur laquelle une série d'Ag est déposée en bandes étroites parallèles à l'aide d'un premier réseau microfluidique (Figure 23), les Ag de chaque ligne peuvent être reconnus par des Ac spécifiques contenus dans des échantillons guidés à l'aide d'un second réseau microfluidique orthogonal au premier. Ce dispositif permet de réaliser des immunoessais en micro-mosaïque ou  $\mu$ -MIA [51] pour micromosaic immunoassay, le résultat mène à une mosaïque de signaux fluorescents à partir des zones où se sont croisés un Ag et son Ac spécifique. Ce dispositif permet en outre une évaluation quantitative d'Ac présents dans des échantillons. Par rapport aux supports classiques, ce type de plateforme permet de réaliser des

analyses sur une surface plus compacte avec des volumes de quelques nanolitres seulement et des temps d'incubation de quelques minutes.

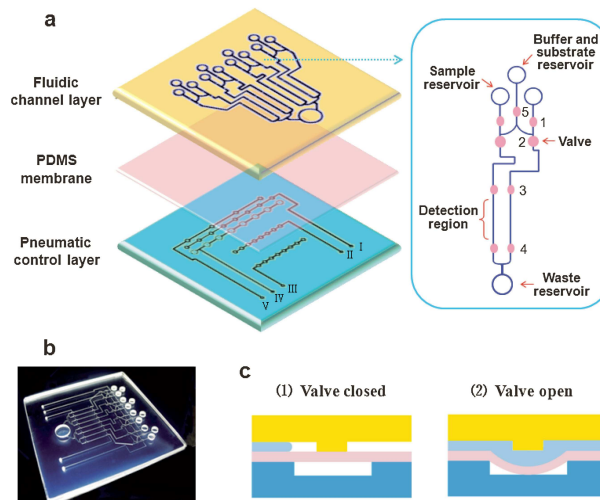


**Figure 23. Étapes d'un immunoessai de type micromosaïque.** L'Ag est immobilisé en surface (A), les sites non recouverts sont saturés par la BSA (B), les échantillons sont injectés (C) et les mosaïques sont lues par fluorescence (D). (a) Image du microsysteme utilisé pour le contrôle des flux. (b) Image des piliers créant une force de capillarité à l'extrémité du canal. (c) Image des valves permettant au liquide de rester confiné dans le capillaire pour éviter les reflux. Extrait de [51,52].

Dans une optique de haut débit d'analyse, le contrôle des flux est un paramètre essentiel en microfluidique. Le système de  $\mu$ -MIA s'est vu amélioré en utilisant un microsysteme composé de huit capillaires pour drainer les fluides sur lesquels se pose le bloc de PDMS fonctionnalisé avec les Ac de capture [52]. La combinaison des piliers placés à l'extrémité des canaux et d'une évaporation localisée du liquide (gérée par effet Peltier) dans la zone de piliers permet un écoulement actif et continu des liquides dans le capillaire par effet de capillarité. Ce système permet d'optimiser les temps d'incubation et de réduire la consommation d'échantillon à  $0,3 \mu\text{L}$ . La limitation du système est liée au fait qu'il faille deux puces pour l'analyse, la première pour la capture de l'analyte, la seconde pour l'injection de l'Ac de détection.

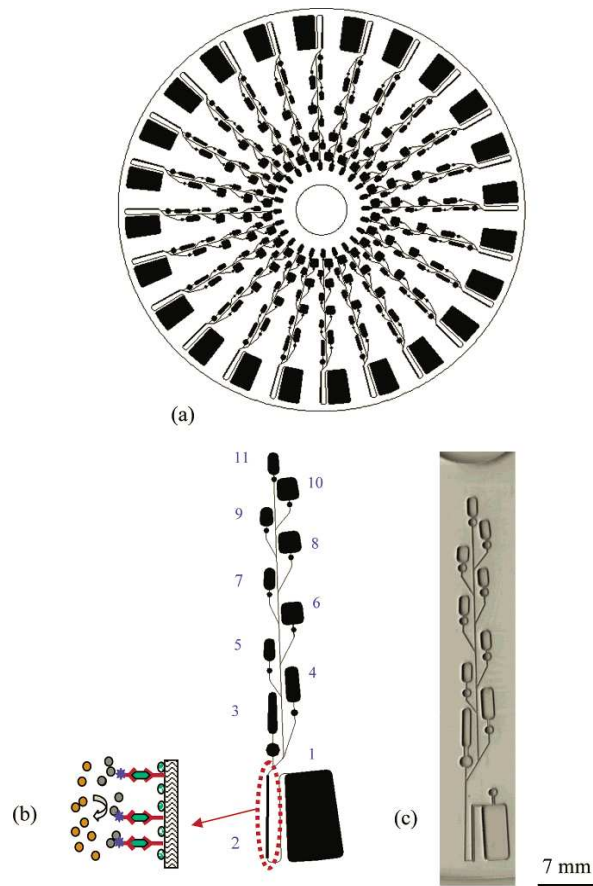
L'intégration de pompes [53] et de valves [54] permet également de contrôler et distribuer des fluides en séquences pour faire du haut débit d'analyses comme l'a montré le groupe de Lin [55] (Figure 24). Les valves en PDMS sont contrôlées par un système pneumatique. La variation de la pression appliquée permettra de plaquer les valves contre la base du canal (fermer) ou de les relâcher (ouvert). Chacun des réactifs est placé dans un puits et relargué dans le canal principal en

ouvrant les valves. L'analyse de clenbuterol a été effectuée dans huit canaux parallèles et de manière simultanée en moins de 30 minutes avec une limite de détection de 0,1 ng/mL et un volume d'échantillon de 3  $\mu$ L.



**Figure 24. (a) Schéma du système microfluidique composé de trois couches, la première et la troisième sont en verre, celle du milieu est en PDMS et prise en sandwich par les deux autres. (b) Image du microsystème final. (c) Vue en coupe des microvalves. Extrait de [55].**

Une manière originale de contrôler les flux est celle élaborée par Lai *et al.* [56] qui ont développé un dispositif microfluidique intégré sur un compact disque (CD) en plastique adapté pour réaliser des tests ELISA. Ce CD est composé de 24 canaux indépendants au sein desquels se déroule l'analyse (Figure 25). Chacun des tampons de rinçage et réactifs est préalablement placé dans des réservoirs reliés au canal principal. Les fluides seront séquentiellement propulsés dans le canal en jouant sur la vitesse de rotation du CD. Le canal contient une chambre réactionnelle où seront propulsés tous les réactifs. La détection se fait à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence. Chaque incubation dure environ 15 minutes et 10  $\mu$ l de réactifs sont consommés pour chaque analyse. Ce système assure un haut degré d'automatisation et l'analyse de différents analytes en parallèle, ce système est aujourd'hui commercialisé. Néanmoins, il nécessite l'utilisation d'un matériel très spécifique comme un lecteur de disque adapté à ces analyses. Le format CD a été utilisé récemment en intégrant des particules millimétriques et permettant une analyse plus complète du sang (enzyme, glucose, cholestérol) en plus de l'immunoessai pour doser la créatine kinase [57], l'analyse est réalisée en 22 minutes au lieu de plusieurs jours.

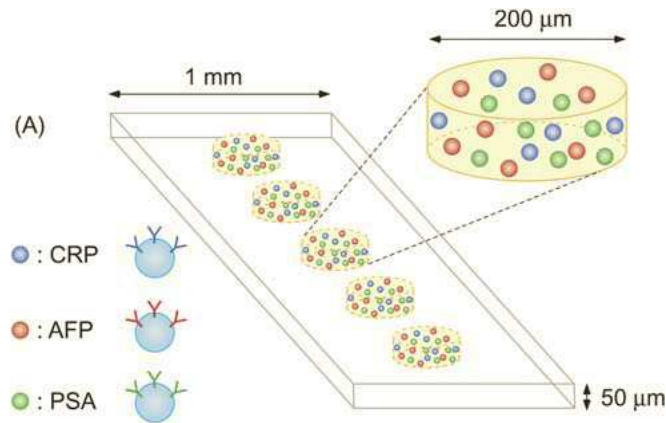


**Figure 25. a) Schéma d'un microsystème au format CD, chaque CD possède 24 canaux indépendants. b) Schéma d'un microcanal et réservoirs associés, chacun des réactifs se situe dans un réservoir. c) Photo d'un microcanal et des réservoirs associés. Extrait de [56].**

Tous les exemples cités précédemment étaient des immunoessais dits de surface où la capture s'effectue à la surface du canal. Dans l'optique d'abaisser encore la limite de détection des analytes, la surface spécifique du canal peut être augmentée.

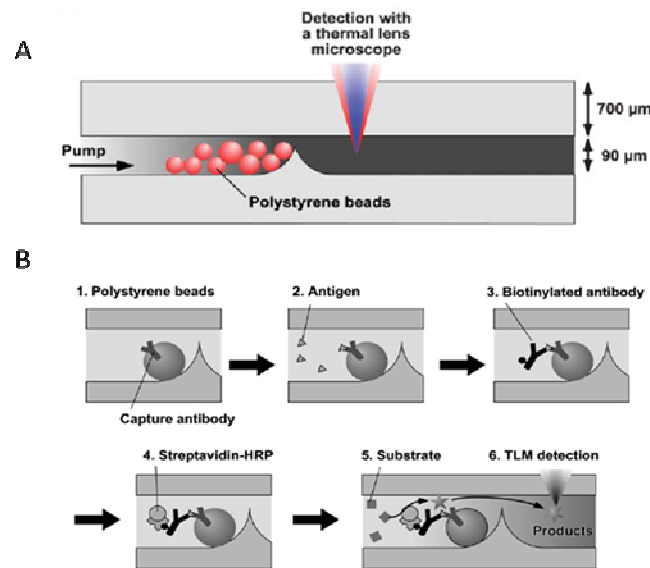
Ainsi Ikami *et al.* ont développé un microcanal intégrant des piliers photo-polymérisés [58] et contenant des particules recouvertes d'Ac de capture (Figure 26). Les piliers d'hydrogel sont poreux, ce qui permet aux analytes de diffuser à travers ces piliers jusqu'à la surface des particules. Ces dernières, faisant  $1\mu\text{m}$  de diamètre, permettent ainsi d'augmenter la surface spécifique du système. L'utilisation de trois types de particules marquées chacune avec un Ac spécifique différent permet le multiplexage de trois biomarqueurs cardiaques (CRP), d'inflammation (AFP) et de cancer (PSA). Le temps total d'analyse est réduit à 5 min et la limite de détection atteint  $0,01\text{ ng/mL}$  avec

un volume total d'échantillon de  $0,5\mu\text{L}$ , ce qui en fait l'un des immunoessais les plus performants, pour l'instant ce système n'est pas encore automatisé.



**Figure 26. Schéma des piliers intégrant des billes micrométriques pour la capture en parallèle de trois biomarqueurs : CRP, AFP, PSA. Extrait de [58].**

L'autre façon d'augmenter la surface spécifique est d'intégrer des microparticules sur une surface pour l'élaboration de microarray [59] ou au sein d'un microcanal sous la forme d'un plug. Le premier à avoir développé cette approche est le groupe de Kitamori qui a transposé la procédure ELISA à la surface de particules de polystyrène comme schématisée sur la figure 27 [60]. Ce système a été élaboré pour le diagnostic du cancer du colon basé sur le dosage de l'Ag carcinoembryonique (CEA). Les particules augmentent la surface spécifique par rapport au canal classique tout en réduisant les distances de diffusion du CEA vers son Ac spécifique. Les réactions ne se font plus en surface mais dans la totalité du volume du canal. Le produit de la réaction enzymatique est détecté par un microscope à lentille thermique ce qui permet d'atteindre une limite de détection de  $0,1 \text{ ng/mL}$  en moins de 40 minutes. Ce système a également été appliqué au dosage des IgE et de la méthamphétamine dans des systèmes automatisés [61].



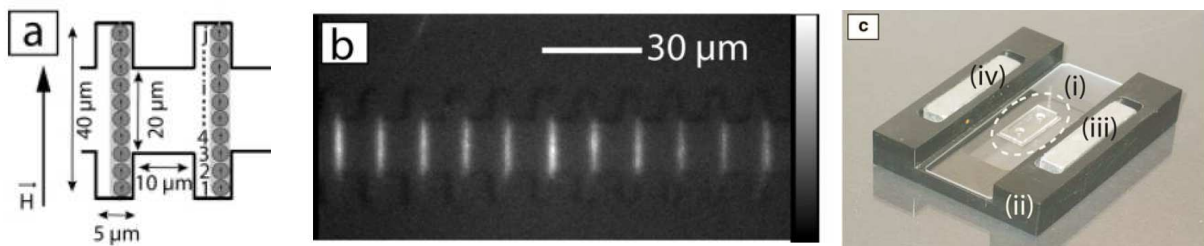
**Figure 27. Schéma de la zone barrage d'une micropuce en verre pour des immunoessais de type ELISA sur billes de polystyrène (A). Illustration schématique des étapes du micro-ELISA (B). Extrait de [60].**

L'utilisation de microbilles nécessite la microfabrication de barrières ou restrictions physiques pour les retenir, la limite de résolution des techniques usuelles de microfabrications impliquant le PDMS est de l'ordre du micron ce qui implique que des particules inférieures à cette taille ne peuvent être retenues. De plus l'agencement des particules contre cette barrière physique se fait de façon aléatoire, il n'y a donc pas de contrôle sur la géométrie du plug obtenu.

L'utilisation de particules magnétiques permet de s'affranchir des contraintes précitées. Ces particules sont faites d'un cœur magnétique encapsulé dans une coquille de polymère qui peut être fonctionnalisée avec les molécules d'intérêt. Ces particules magnétiques peuvent être retenues dans le canal par l'application d'un champ magnétique. Ainsi, la microfabrication de restriction physique n'est plus nécessaire et permet d'appliquer des débits plus importants car la résistance hydrodynamique est moindre.

Il existe différentes approches pour capturer ces particules magnétiques, le groupe de Girault a étudié l'effet de différentes configurations d'aimant sur la formation de plug de billes magnétiques. La configuration la plus simple consiste à mettre un aimant près du canal, le plug de particule formé ne sera pas homogène et ne se formera que sur un côté du canal [62]. L'utilisation de deux aimants en attraction permet d'obtenir un plug de particules homogène dans le canal. Une fois le plug formé, des immunoessais de type ELISA peuvent être effectués comme vu précédemment.

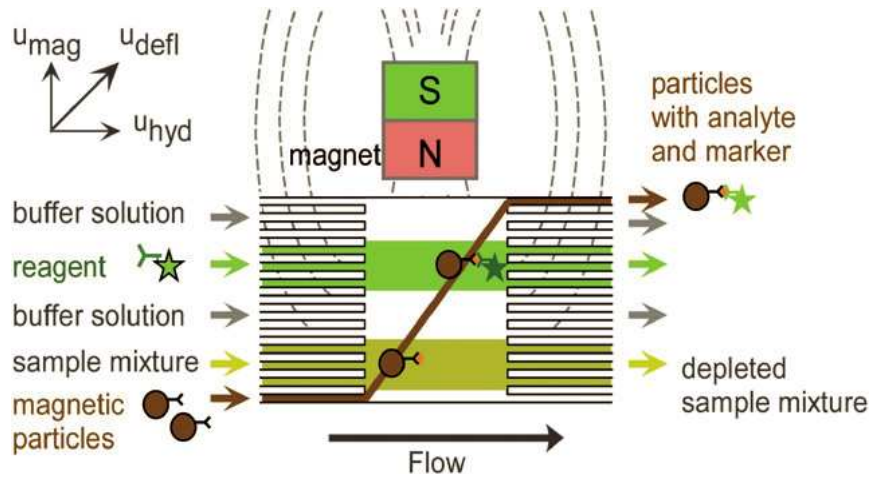
L'utilisation de champ magnétique permet d'obtenir des architectures particulières comme des colonnes de particules au sein du microcanal. Démontrée par l'équipe de Viovy pour la séparation de molécules d'ADN [63], cette approche basée sur des colonnes de billes a été transposée par la suite par l'équipe de Gijs pour les immunoessais (Figure 28). L'utilisation d'un champ magnétique homogène et d'une géométrie particulière, faite de cavités répétées de façon périodique, permettent d'obtenir une série de colonnes de particules au sein du canal. Cette disposition augmente la perfusion des fluides à travers les particules et favorise les interactions avec les molécules que l'on désire analyser. Ce système permet également de réduire d'un facteur 10 le nombre de billes utilisées par rapport à un plug classique. Après avoir injecté séquentiellement les réactifs, la lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Au final, le système est très simple d'utilisation et ne requiert pas de matériel spécifique.



**Figure 28. (a) Formation de colonnes de billes magnétiques grâce au champ magnétique homogène et aux microcavités. (b) Image fluorescente observée après la procédure complète de l'immunoessai. (c) Photographie du microsystème (i) du bloc support (ii) et des deux aimants en attraction (iii, iv). Extrait de [64].**

Dans l'exemple précédent, les particules magnétiques sont statiques, d'autres groupes ont utilisé les gradients de champ magnétique pour faire migrer ces particules : c'est le principe de la magnétophorèse. Le groupe de Pamme [65] a élaboré un système illustré en figure 29. Un gradient de champ magnétique permet de faire migrer une particule magnétique d'une extrémité à l'autre du canal en présence d'un flux hydrodynamique. Durant son trajet, la particule va traverser une succession de flux laminaires contenant dans l'ordre l'analyte, la solution de rinçage, l'Ac de détection puis à nouveau la solution de rinçage. Toute l'analyse s'effectue en flux continu en moins de 60 secondes mais souffre d'une sensibilité plus faible (20 ng/mL) que les approches citées plus haut.





**Figure 29. Schéma de l'analyse en flux continu où les microparticules magnétiques vont successivement réagir avec la cible puis avec l'Ac de détection. Extrait de [65].**

Certains de ces exemples montrent qu'une des limitations des microsystèmes peut être liée à la difficulté d'intégration des systèmes de détection. Rares sont les systèmes microanalytiques pouvant s'affranchir d'appareillages annexes, encombrants et surtout très coûteux. Dans l'optique de pouvoir développer des techniques analytiques bon marché, deux exemples sont ici brièvement abordés. L'équipe de Whitesides [66, 67] a élaboré un laboratoire sur papier. L'approche est identique aux techniques ELISA en microplaque, 96 zones circulaires sont fonctionnalisées avec des Ac de capture pour la détection d'Ac anti HIV, chaque analyse nécessite  $3\mu\text{L}$  d'échantillon et l'analyse se déroule en 50 minutes. La détection peut s'effectuer avec un scanner (coût 100 \$) et pourrait donc permettre le diagnostic à moindre coût dans les pays en voie de développement. Le principal inconvénient est lié à la perte de sensibilité d'un facteur 10 par rapport aux microplaques classiques.

Une autre approche intègre des électrodes d'or recouvertes d'Ac de capture, la formation du complexe Ag-Ac augmente la résistance électrique [68] qui est proportionnelle à la quantité de la cible capturée. Cette approche permet de détecter des Ac à  $1\text{ ng/mL}$  à moindre coût (3 € par microsystème).

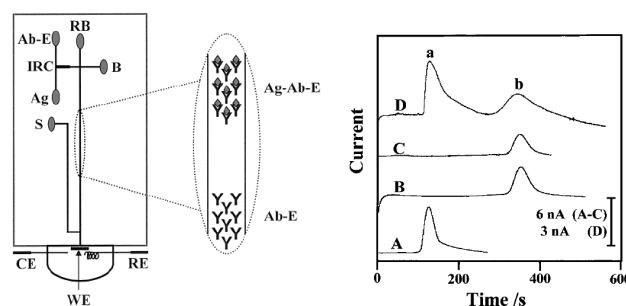
### *III.2.2°) Immunoessais en phase homogène à l'échelle du microsystème*

Le développement des immunoessais en phase homogène en microsystèmes a également présenté des designs originaux mais le nombre d'études reste limité comparé aux exemples rapportés en

phase hétérogène. Le principe de la phase homogène en micropuce reste identique à celui décrit plus haut. L'Ag et l'Ac diffusent librement et réagissent en solution. Les réactions immunologiques peuvent avoir lieu en dehors de la puce (off chip) ou dans le microcanal (on chip).

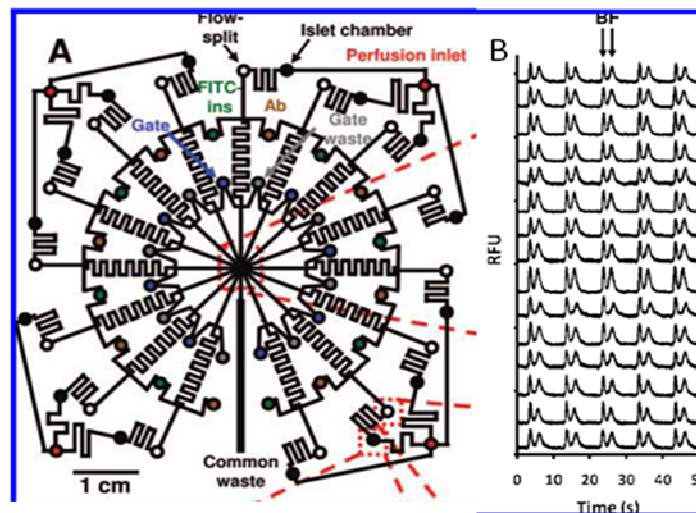
Il s'agit la plupart du temps de la transposition au format micropuce d'immunoessais préalablement développés en EC avec une détection UV, fluorescente ou électrochimique. De nombreux types de molécules peuvent être quantifiées comme le cortisol [69], des protéines [70] ou encore le TNT [71] et l'ensemble des techniques électrophorétiques comme l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ), l'isotachophorèse (ITP), l'électrophorèse en gel ou celle basée sur les différences de points isoélectriques (pI) des molécules ont été mises en œuvre.

Wang *et al* [72] ont couplé l'ECZ à une détection électrochimique, plus rare que les détections UV et fluorescente et qui permet d'augmenter la sensibilité des systèmes d'un facteur 1000. De plus ce type de détection s'affranchit des microscopes et peut se faire en utilisant des voltmètres portatifs, ce qui implique une possible détection sur site. Dans l'exemple présenté figure 30, le réservoir Ab-E est rempli par la solution d'Ac marqués à la phosphatase alcaline, le réservoir Ag par la solution d'Ag et la complexation a lieu dans la chambre de réaction après mélange des deux solutions. Les formes libres et liées de l'Ac sont ensuite séparées par ECZ. Le réservoir S est quant à lui rempli par une solution de 4-aminophényl-phosphate (p-APP), un des substrats de la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline permet la conversion du p-APP en 4-aminophénol et ainsi la détection des formes libres et du complexe par voie électrochimique. Lorsque la concentration en Ag augmente le courant engendré par le complexe Ag-Ab-E augmente et celui de Ab-E diminue. La précision et la sensibilité des essais dépendent alors généralement de la qualité de la séparation électrophorétique, facilement affectée par la composition de l'échantillon.



**Figure 30. Schéma d'une micropuce pour des immunoessais basés sur l'électrophorèse capillaire de zone.** Ab-E : anticorps marqués par une enzyme ; Ag : antigène ; IRC : chambre d'immunoréaction ; CE, WE et RE : électrode de détection. Electrophorégramme obtenu après migration de Ag-Ab-E (D,a) de Ab-E (D,b), de Ab-E seul (C, B) et de Ag-Ab-E seul (A). Extrait de [72].

Le débit d'analyses peut être amélioré en intégrant plusieurs canaux en parallèle sur un même support. Le groupe de Kennedy [73] est en mesure de quantifier de l'insuline dans 15 canaux parallèles et indépendants les uns des autres (Figure 31). L'immunoessai est de type compétitif entre l'insuline non marquée à doser et l'insuline marquée au FITC. Ces deux espèces sont en compétition pour l'Ac anti-insuline, le complexe ainsi formé est séparé par ECZ des formes libres en l'espace de 10 secondes dans les 15 canaux en même temps. Tous les canaux convergent vers un même point pour faciliter la détection en parallèle. Ce système permet d'effectuer plus de 5 000 immunoessais par heure. Les profils électrophorétiques montrent une grande répétabilité des séparations.

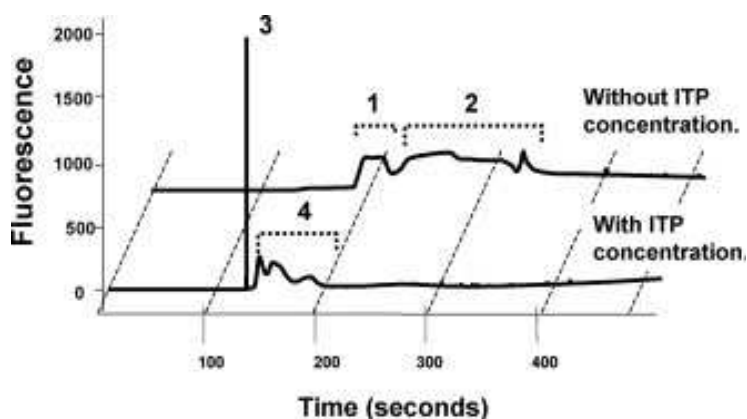


**Figure 31. Schéma d'un microsysteme multicanaux dédié à l'électrophorèse. A)** Les 15 canaux (traits noirs) sont reliés à des réservoirs contenant les échantillons à analyser. Tous les canaux de séparation convergent vers un même réservoir « poubelle » où les molécules cibles (l'insuline) seront détectées par fluorescence juste avant de pénétrer dans ce réservoir. **B)**

**Electrophorogrammes obtenus dans les 15 canaux en parallèle pour la séparation de l'insuline libre (F) et liée (B) à son Ac.** 5 séparations successives peuvent être effectuées dans chaque canal en l'espace d'une minute. Extrait de [73].

Bien que la détection électrochimique citée plus haut permette d'augmenter la sensibilité, la plupart des immunoessais en phase homogène restent moins performants en termes de limite de détection que ceux se déroulant en phase hétérogène. Pour pallier ce problème, les techniques électrophorétiques peuvent être mises à contribution pour des étapes de préconcentration.

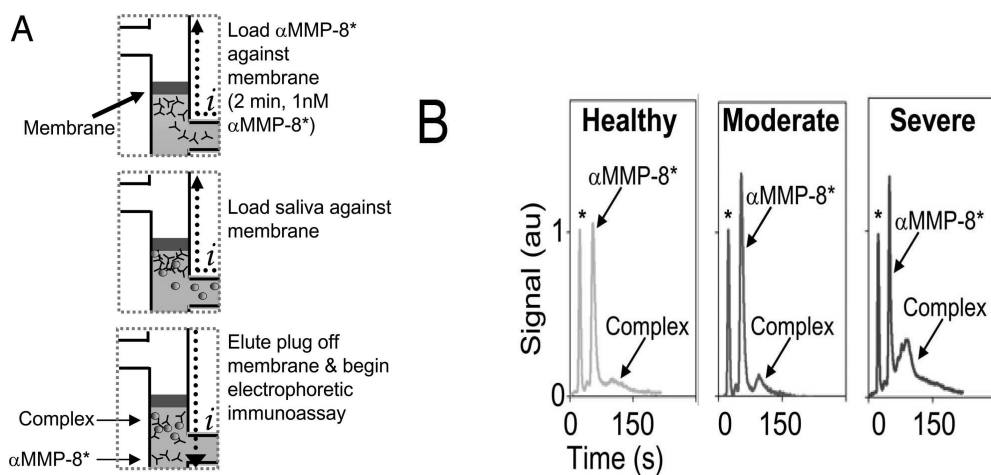
L'équipe de Kawabata [74] a ainsi développé un système de préconcentration basé sur l'ITP. Dans ce cas, deux électrolytes différents sont nécessaires à la réalisation de l'ITP, l'un composé d'un ion meneur et l'autre d'un ion terminal. L'analyte à préconcentrer doit avoir une mobilité intermédiaire à ces deux ions. Il va ainsi apparaître des zones de conductivités différentes et donc des champs électriques locaux qui vont varier pour assurer une densité de courant constante. Chaque zone est composée d'ions de mobilité identique, si l'analyte chargé sort de sa zone il va être soumis à un champ électrique plus faible (à l'avant) ou plus élevé (à l'arrière) ce qui aura donc tendance à le ramener dans sa zone. Il en résulte une préconcentration de l'analyte (l' $\alpha$ -fetoprotéine). Ce dernier réagit avec deux Ac, l'Ac1 et l'Ac2 marqué par une molécule fluorescente. L'Ac1 est tout d'abord préconcentré par ITP avant de réagir avec l'analyte, ce complexe migre ensuite vers la zone de l'Ac2. Le complexe Ac1-analyte-Ac2 est ensuite séparé des formes libres par ECZ et détecté par mesure de fluorescence. Le facteur de préconcentration observé est de 140 et la limite de détection est abaissée du même facteur. Cette approche permet également d'obtenir des pics plus fins et mieux résolus (Figure 32). Le temps total d'analyse est de 130 s. La formation d'un sandwich avec deux Ac était nécessaire car la différence de mobilité entre l'analyte et le complexe Ac1-analyte n'était pas suffisante.



**Figure 32. Comparaison des pics obtenus avec et sans ITP.** 1 et 3 représentent le complexe Ac1-analyte-Ac2 et 2 et 4 représentent l'Ac2 libre. Extrait de [74].

Le groupe de Singh [75] a lui utilisé des gels de polyacrylamide photo-polymérisés pour réaliser l'étape de préconcentration. Leur étude portait sur le diagnostic des parodontites qui consiste à mesurer la quantité d'une enzyme (MMP-8) présente dans la salive. L'originalité de ces travaux repose sur la photo-polymérisation de gels de polyacrylamide avec des tailles de pores variables

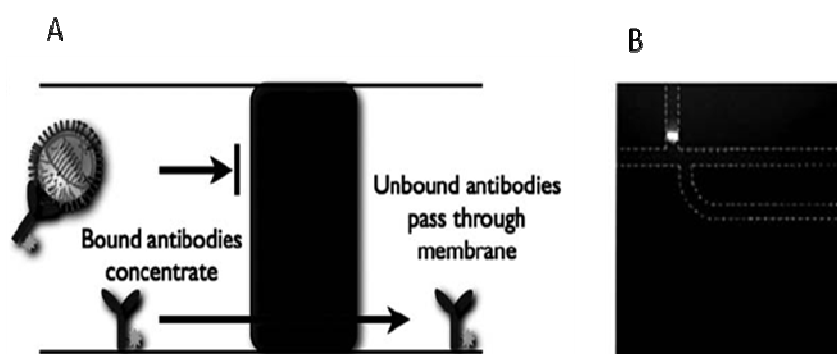
selon les zones qui permettront ainsi la préconcentration et la séparation. Dans un premier temps les Ac anti-MMP-8 sont injectés et concentrés contre le gel de polyacrylamide, ensuite l'échantillon de salive contenant la MMP-8 est injecté et réagit avec leurs Ac spécifiques. La migration de ces échantillons vers la membrane est assurée par l'application d'un champ électrique. Une fois le complexe formé, il est séparé des formes libres au sein d'un gel qui permet le tri en taille (Figure 33A). Le temps d'analyse est inférieur à 10 minutes en utilisant 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon et permet de discriminer les patients atteints des patients sains en comparant l'aire du pic du complexe (Figure 33B)



**Figure 33. (A) Schéma montrant la séquence de l'analyse : injection des Ac anti-MMP-8 puis de la salive et préconcentration contre la membrane de polyacrylamide, enfin séparation du complexe et des formes libres. (B) Comparaison des profils électrophorétiques de patients sains et malades de parodontite. Extrait de [75].**

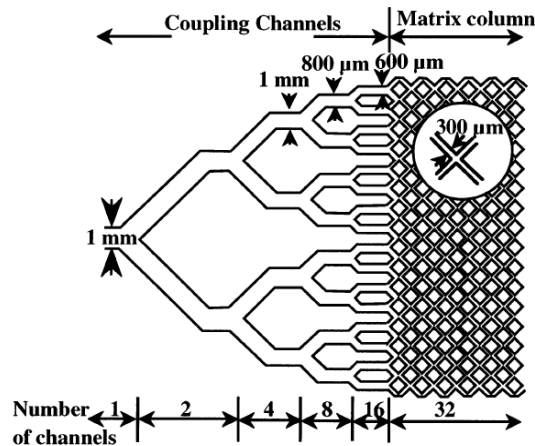
Dans l'exemple précédent, le gel a été utilisé pour préconcentrer l'analyte avant sa séparation, mais ces gels peuvent également servir de barrière pour séparer les complexes des formes libres. En effet, dans certains cas, la mobilité électrophorétique de certains complexes et des formes libres sont très proches, dans ce cas le tri par la taille peut être effectué en utilisant des gels de polyacrylamide dont les pores nanométriques retiendront les molécules les plus volumineuses et laisseront passer les plus petites. Ce type de technique a été utilisé pour la recherche de virus de la grippe porcine. Comme illustré figure 34, le complexe est filtré et préconcentré contre la membrane qui laisse passer les formes libres. Le temps d'analyse est de 5 minutes et la consommation d'échantillon de 50  $\mu\text{L}$ . La présence de cette membrane peut provoquer un phénomène de "clogging" par les

particules de tailles micrométriques ce qui implique une première filtration de l'échantillon avant l'analyse.



**Figure 34. Séparation du complexe immunitaire et de l'Ac libre par une membrane de polyacrylamide (A). Détection par fluorescence du complexe virus-Ac retenu par la membrane (B). Extrait de [76].**

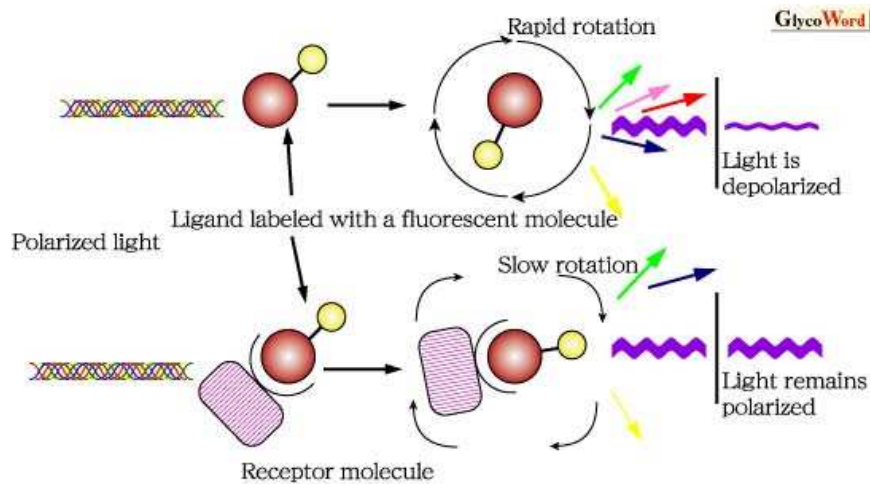
Des immunoessais ont également été combinés à des techniques chromatographiques au sein des microsystèmes analytiques. Un design particulier de canaux multiples appelé système COMOSS (collocated monolith support structures) [77] a été élaboré pour augmenter la surface spécifique du système et ainsi mimer les particules de silice présentes au sein des colonnes chromatographiques comme schématisé en figure 35. Cette matrice a été fonctionnalisée avec des groupements chargés négativement afin de se comporter comme un support échangeur de cations. Les molécules chargées positivement seront donc retenues. L'histamine et l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (HCG) ont été dosées par cette technique [78, 79]. Prenons l'exemple de l'HGC, l'Ac anti-HCG (IgG) a été fonctionnalisé avec du ferrocène (Fc) qui apporte un caractère redox et permettra la détection électrochimique. Dans un premier temps, la capture de la cible (HCG) s'effectue en solution. Les  $pI$  des différents partenaires sont les suivants : Fc-IgG (7,0), HCG (4,7) et le complexe Fc-IgG-HCG (5,6), le tampon d'analyse étant fixé à pH 6, la charge des molécules sera donc positive pour Fc-IgG et négative pour les deux autres. Les Fc-IgG seront donc retenus sur la matrice et séparés du complexe qui sera détecté en sortie du canal. Cette approche permet d'obtenir un diagnostic de grossesse en 30 minutes, la matrice échangeuse de cations peut être régénérée en éluant les Fc-IgG accumulés sur la matrice et le système peut être réutilisé. Ce système souffre d'une sensibilité amoindrie d'un facteur 100 par rapport aux autres techniques comme l'HPLC mais cette dernière nécessite un prétraitement de l'échantillon avant analyse ce qui alourdit la procédure.



**Figure 35.** Schéma montrant la configuration multicanaux du microsysteme mimant les colonnes chromatographiques. Extrait de [78].

La majorité des immunoessais en phase homogène est basée sur la mise en œuvre de séparations électrophorétiques. Néanmoins, dans le cas de canaux en PDMS, la chimie de surface et le rapport surface sur volume important peuvent être à l'origine de phénomènes d'adsorption très pénalisants dans le cas d'analyses électrocinétiques quantitatives. Il est souvent nécessaire de développer en parallèle des traitements de surface similaires à ceux développés pour les capillaires de silice.

Pour s'affranchir de ces contraintes, des techniques en phase homogène ont été développées pour lesquelles la séparation des partenaires n'est plus nécessaire, ces approches restent rares par rapport aux approches précédemment citées. L'une d'elles est basée sur la polarisation de fluorescence qui repose sur les propriétés de mouvements rotationnels des molécules (Figure 36). Les molécules sont excitées par une lumière polarisée (qui se propage dans une direction), les grosses molécules ou complexes ont une vitesse rotationnelle faible et réémettent une lumière polarisée, les plus petites molécules ont une vitesse rotationnelle plus élevée et réémettent une lumière dépolarisée (diffuse dans toutes les directions).



**Figure 36. Schéma explicatif de la polarisation de fluorescence appliquée aux immunoessais. Extrait de [www.glycoforum.jp](http://www.glycoforum.jp).**

Le groupe de Baba [80] a utilisé cette technique pour le dosage de la théophylline dans un sérum. Les complexes Ag-Ac vont réémettre une lumière polarisée et l'espèce libre réémet une lumière dépolarisée. Ainsi, les étapes de rinçage et de séparation ne sont pas nécessaires, la procédure est simplifiée et l'architecture du canal est des plus simples. L'analyse peut s'effectuer en 65 s au sein d'un canal en verre réutilisable mais plus chère que le PDMS. De plus, ce type d'analyse offre une sensibilité très réduite (d'un facteur 1000) et nécessite une microscopie bien particulière composée de filtres polarisants.

Nous venons de voir que les microsystèmes permettent de mettre en œuvre des méthodes d'immunodosage très diverses et ce avec de nombreux types de supports. Le grand challenge de la microfluidique reste actuellement l'intégration des systèmes de détection. En effet, l'ensemble des exemples cités plus hauts sont basés sur des techniques optiques tributaires de différents appareillages : microscope, lampe, camera... La facilité d'intégration des électrodes au sein des microsystèmes a permis de développer les détections électrochimiques citées précédemment.

Un kit de diagnostic basé sur la technique ELISA a été élaboré et commercialisé par diagnoSwiss. Ce kit d'analyse combine des billes micrométriques et des microsystèmes pour l'analyse de différentes cibles (HCG, AFP, Testosterone, Progesterone...). L'un des protocoles proposés consiste à capturer la cible off chip avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec l'Ac de capture. Un Ac de détection marqué par une enzyme réagit ensuite avec la cible pour former le sandwich. Après 10 minutes d'incubation, 30µL de la solution sont injectés dans le microsystème et

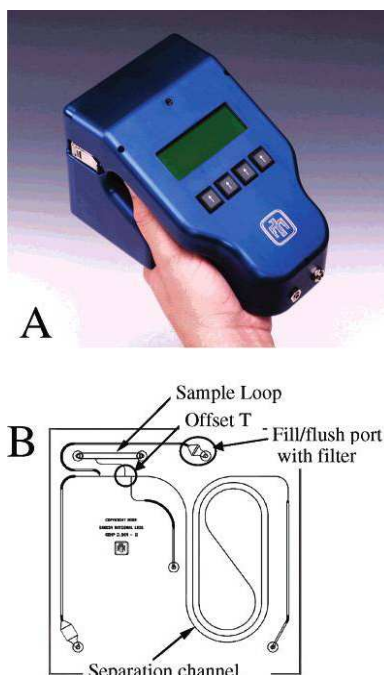


les billes sont magnétiquement concentrées avant l'étape de détection. L'enzyme permet la transformation d'un substrat en un produit détectable par des microélectrodes. Ainsi 16 échantillons peuvent être analysés en parallèle en l'espace de 15 minutes tout en réduisant la consommation d'échantillon d'un facteur 10 par rapport aux techniques conventionnelles en microplaque.



**Figure 37. Microsystème dédié à des analyses de type micro-ELISA développé par diagnoSwiss.**

D'autres études se sont portées sur l'intégration de détections fluorescentes (figure 37). Cette cartouche portable intègre un microsystème en verre pour faire des séparations en ECZ et un système de détection de fluorescence en plus de l'ensemble du bloc électronique qui permet de contrôler le système [81]. Ce microlaboratoire permet d'effectuer des analyses en l'espace de 5 minutes avec une bonne sensibilité et en consommant  $0,3\mu\text{L}$  d'échantillon. Ce système n'a pas été appliqué directement aux immunoessais mais permet la séparation de protéines. Notons également des premières ébauches d'intégration de systèmes basés sur des détections de type SPR [82-86], DLS [87] ou encore magnétiques [88].



**Figure 37. (A) Image du microlaboratoire et (B) de la puce permettant les séparations électrophorétiques. Extrait de [81].**

#### **IV°) Les nanoparticules : plateformes nanométriques appliquées aux immunoessais**

Au même titre que les microsystèmes, les nanotechnologies ont connu un essor considérable ces vingt dernières années. Les avancées notables de la physique et de la chimie ont permis de concevoir et de manipuler des objets à l'échelle nanométrique. Ces nanotechnologies ont radicalement changé le monde de l'informatique conduisant à des ordinateurs toujours plus performants. Dans le monde de la médecine, des nanoplateformes ont été élaborées pour l'imagerie et pour le relargage de médicaments en des points très localisés de l'organisme, leurs tailles nanométriques leur assurent un caractère furtif vis-à-vis du système immunitaire. Mais ces nanoparticules sont susceptibles de pénétrer et de s'accumuler dans les organes et l'évaluation des risques toxiques est encore en cours. En 2007, la base de données Nanowerk recensait plus de 1350 nanoparticules commercialisées toutes disciplines confondues.

Le développement de nouvelles techniques exploitant les propriétés des nanoparticules a également vu le jour dans le domaine de la bioanalytique. Les nanomatériaux proposent des caractéristiques de

diffusion et des propriétés optiques, électriques et magnétiques qui en font des candidats indiscutables pour la biodétection.

Dans cette partie nous tenterons d'offrir un aperçu des différents immunoessais à l'échelle nanométrique.

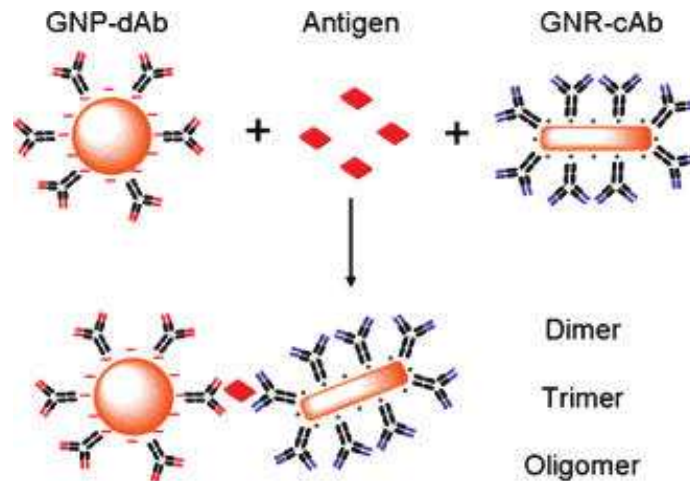
Des nanoparticules très diverses et présentant des caractéristiques physico-chimiques très particulières ont été développées, citons par exemple les liposomes, les nanotubes de carbone, les nanoparticules organiques ou encore les nanoparticules inorganiques (or, argent, silice..). Notons que les quantum dots sont des cristaux semi-conducteurs à l'échelle nanométrique utilisés comme une nouvelle classe de fluorophore plus stable que les molécules fluorescentes organiques. Ils sont utilisés quasi essentiellement pour les étapes de détection et ne seront donc pas abordés en tant qu'objet de support de l'immunoessai, une revue très complète informera le lecteur sur leurs synthèses et leurs applications [89].

Les nanoparticules inorganiques sont les plus utilisées dans le domaine bioanalytique. Nous commencerons par présenter les nanoparticules d'or, probablement les plus répandues dans le domaine analytique, puis nous verrons le cas de nanofilaments utilisés en tant que code barres ou semi conducteur pour le multiplexage offrant ainsi des alternatives intéressantes par rapport aux détections classiques. Enfin, nous nous focaliserons sur les nanoparticules magnétiques, support que nous avons développé et utilisé au cours de cette thèse. Ce chapitre est découpé en fonction de chacun des types de nanoparticules car c'est leur nature qui va conditionner le type d'applications.

#### IV.1°) Les nanoparticules d'or

Ces nanoparticules sont certainement les plus étudiées et les plus employées dans le domaine analytique. Leur synthèse est basée sur celle de Turkevich *et al.* [90]. Ces objets ont été utilisés en tant que support de l'interaction Ag/Ac mais également en tant que sonde pour la détection. En effet, ces particules présentent des propriétés optiques et électriques qui ont été très largement exploitées pour les bioanalyses. Les nanoparticules d'or présentent également des propriétés colloïdales intéressantes. Le faible diamètre de ces objets (souvent entre 10 et 50 nm) favorise leur diffusion et la capture de la cible en solution. Ces propriétés ont été utilisées pour le développement d'immunoessais en phase homogène basés sur la technique d'agglutination [91]. Dans l'exemple de la figure 38, des nanoparticules d'or sphériques et en bâtonnets ont été respectivement fonctionnalisées avec un Ac de capture et un Ac de détection. Lorsque ces deux objets sont mis en

présence de la cible (ici un marqueur de cancer : carcinoembryonnic antigen (CEA)) il y a formation d'agrégats qui pourront être détectés par la technique de diffusion de lumière (DLS). La DLS permet de mesurer des objets de taille nanométrique en solution. Plus la concentration de la cible augmente et plus le nombre d'agrégats sera élevé.

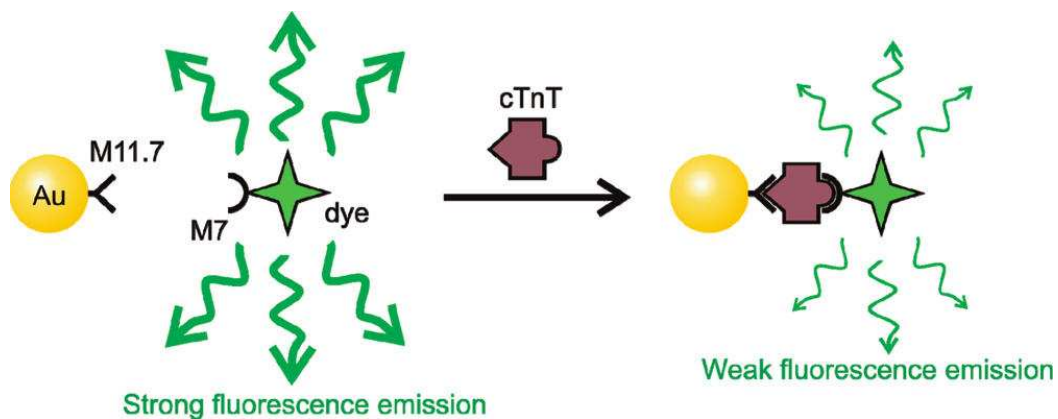


**Figure 38. Schéma d'un immunoessai en phase homogène basé sur la technique d'agglutination.** *GNP: gold nanoparticles, GNR: gold nanorods, d-Ab : Ac de détection, c-Ab : Ac de capture. Extrait de [91].*

L'intérêt de cette approche est identique aux techniques d'agglutination mentionnées précédemment, l'immunoessai se déroule en une étape, les étapes de lavage et de séparation étant inutiles. La consommation d'échantillon reste faible ( $3,5 \mu\text{L}$ ) et la limite de détection est de l'ordre de  $0,1 \text{ ng/mL}$  notamment grâce à la sensibilité des techniques de DLS. La principale limitation de ce système est liée à l'utilisation de nanoplateformes qui peuvent s'agréger spontanément et révéler de faux positifs. Cela nécessite au préalable une étude de l'influence du pH et de la force ionique [92].

Ce sont les propriétés optiques des nanoparticules d'or qui ont été exploitées dans l'étude menée par Mayilo *et al* [93], leur technique étant basée sur celle du FRET évoquée plus haut. En effet les nanoparticules d'or ont la capacité de « quencher » le signal de sondes fluorescentes comme illustré figure 39. La nanoparticule d'or est fonctionnalisée avec l'Ac de capture qui permet de piéger la molécule cible. Un Ac de détection marqué avec un fluorophore va également réagir avec la cible pour former un sandwich. Les nanoparticules présentent un spectre d'absorption qui recouvre le

spectre d'émission du fluorophore. Dès que ces deux éléments sont suffisamment proches l'un de l'autre, c'est à dire après la formation du sandwich, il y a transfert d'énergie de la sonde fluorescente vers la nanoparticule d'or, l'émission de fluorescence diminue. Le signal est ainsi inversement proportionnel à la concentration de la cible. Cet immunoessai se déroule également en phase homogène, en une étape et atteint une sensibilité de 0,5 ng/mL pour le dosage d'une protéine cardiaque. Cette approche souffre d'un important bruit de fond et la sensibilité de la technique dépend fortement des sites d'ancrage du fluorophore sur l'Ac de détection ce qui peut modifier son affinité pour l'Ag. De plus, la notion de distance entre la sonde fluorescente et la nanoparticule d'or doit être prise en compte en ce qui concerne l'efficacité du phénomène de quenching. Notons enfin que le choix du fluorophore reste limité car son spectre d'émission doit recouvrir le spectre d'excitation des nanoparticules d'or.



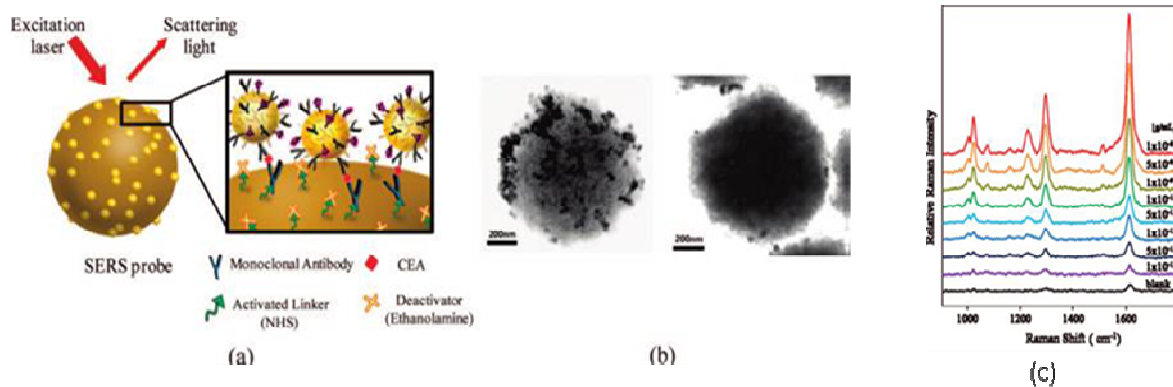
**Figure 39. Principe de l'immunoessai en phase homogène basé sur le quenching de fluorescence par des nanoparticules d'or. Extrait de [93].**

Cette approche de quenching par les nanoparticules d'or a également été développée en microplaque [94]. Après formation du sandwich, le complexe est dissocié et les nanoparticules d'or, qui étaient couplées à l'Ac de détection, vont "quencher" la solution de fluorescéine rajoutée dans le puits lors de la dernière étape de détection, la concentration de la cible est inversement proportionnelle au signal de fluorescence. Dans cet exemple, le problème de distance entre l'émetteur et la nanoparticule n'est plus considéré et la procédure en microplaque est simplifiée.

L'utilisation des nanoparticules d'or en tant que support de la réaction reste rare comparée aux nombreux travaux portant sur leur utilisation comme sonde de détection pour l'amplification du

signal. Du fait de leurs propriétés optiques, ces nanoparticules ont été principalement couplées aux techniques de SPR et de SERS (surface enhanced Raman scattering).

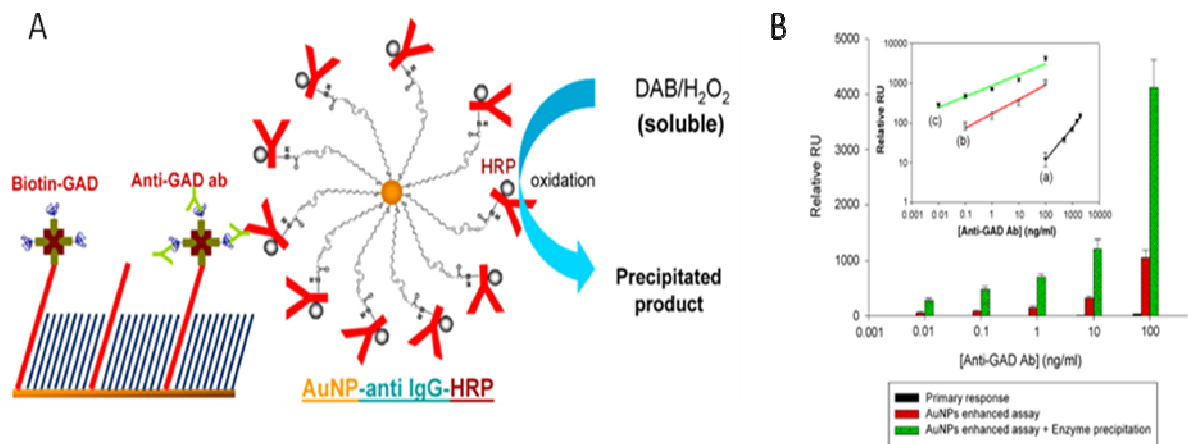
Le SERS est basé sur la diffusion Raman des molécules et ses mécanismes, lorsqu'ils sont couplés aux nanoparticules, font encore débat. L'une des théories les plus évoquées serait que les nanoparticules pourraient concentrer le champ électromagnétique à leur surface et ainsi augmenter l'intensité de la lumière diffusée [95]. Le SERS a notamment été mis en œuvre pour le dosage d'un biomarqueur (CEA) du cancer [96]. Cet Ag est capturé à la surface de billes magnétiques, la nanoparticule d'or fonctionnalisée avec l'Ac anti-CEA va ensuite réagir à la surface des billes pour former le sandwich (Figure 40). Ces nanoparticules d'or sont également fonctionnalisées avec une molécule sonde (4,4 -Dipyridyl) qui fournira le spectre Raman caractéristique. Le nombre de nanoparticules d'or engagées dans le sandwich est alors proportionnel au nombre de CEA préalablement capturés. Cette détection par spectrométrie Raman couplée à l'amplification due à la présence des nanoparticules d'or permet d'atteindre une sensibilité de 1 pg/mL en 1 heure d'analyse, la sensibilité est ainsi améliorée d'un facteur 1000 par rapport à l'ELISA en microplaque. Cette approche permet également le multiplexage si l'on attribue à chaque type d'Ac de capture une sonde Raman qui lui est propre.



**Figure 40. (a) Illustration de l'immunoessai en SERS utilisant des nanoparticules d'or pour le dosage du CEA. (b) Image TEM de billes ayant réagi ou non avec le CEA. (c) Spectre Raman obtenu en fonction de la concentration en CEA. Extrait de [96].**

La technique SPR a été évoquée précédemment, nous avons souligné le fait que cette technique permettait de quantifier des Ag ou des Ac sans étape de marquage mais que la sensibilité restait limitée. Pour pallier ce problème, les nanoparticules d'or ont permis d'amplifier les performances de la SPR. Dans les techniques classiques de SPR, la présence d'un complexe immunitaire à la surface

du film d'or entraîne un léger changement d'angle de réfraction (environ  $0,1^\circ$ ) dépendant de la quantité de complexe immunitaire en surface. La présence de nanoparticules d'or, fonctionnalisées par l'un des partenaires immunologiques, permet de créer un effet cumulatif des plasmons de surfaces de la nanoparticule et du film d'or augmentant ainsi la variation de l'angle de réfraction jusqu'à  $1,5^\circ$ . La présence des nanoparticules d'or augmente la sensibilité d'un facteur 30 [97]. Cette sensibilité peut encore être augmentée en utilisant des nanoparticules d'or couplées à l'enzyme HRP qui donnera un produit sous la forme d'un précipité se déposant sur le film d'or du support (Figure 41). La présence des nanoparticules d'or et du produit précipité crée un effet de synergie sur l'indice et l'angle de réfraction ce qui abaisse encore d'un facteur  $10^4$  la limite de détection qui atteint  $0,01 \text{ ng/mL}$  lors du dosage d'hormones appliqué au test de grossesse.



**Figure 41. A) Schéma illustrant l'amplification du signal en SPR par le couplage nanoparticule d'or et HRP. B) Comparaison des signaux avec ou sans l'amplification par l'HRP.**

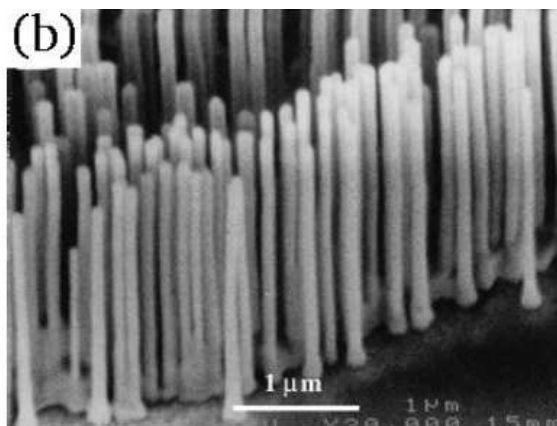
En plus de leurs propriétés optiques, les nanoparticules d'or présentent des propriétés électrochimiques intéressantes. L'étude menée par le groupe de Lin est basée sur le développement d'un microsystème au sein duquel la capture de la protéine A s'effectue par un sandwich classique où l'Ac secondaire est greffé à une nanoparticule d'or. Aux deux extrémités de la zone de capture se trouvent des électrodes, la présence des nanoparticules d'or permet de créer un pont entre les électrodes qui assure le passage des électrons. L'impédance mesurée est inversement proportionnelle à la concentration de la cible. Des études ont montré que l'argent propose des propriétés électrochimiques plus performantes que l'or. Dans ce contexte des ions argent sont précipités à la surface des nanoparticules d'or se comportant ainsi comme un catalyseur redox, il en

résulte un signal amplifié avec une sensibilité de 1 ng/mL pour le dosage d'IgG après 30 minutes d'analyse.

La limitation majeure de ces nanoparticules d'or, lorsqu'elles sont utilisées en tant que support de l'interaction, est liée au fait que les étapes de séparation des complexes et des formes libres se font quasi uniquement à l'aide de centrifugation ce qui alourdit la procédure analytique. Les nanoparticules magnétiques elles s'affranchissent de cette contrainte comme nous le verrons plus loin.

#### IV.2°) les nanofilaments

Les nanofilaments présentent au moins une dimension à l'échelle nanométrique et sont de formes allongés (Figure 42), le rapport d'aspect ne doit pas excéder 25/1 sous peine de fractures du filament. Il existe différentes approches pour synthétiser ces nanofilaments, la plus répandue consiste à utiliser une membrane poreuse au sein de laquelle les métaux seront séquentiellement électrodéposés.



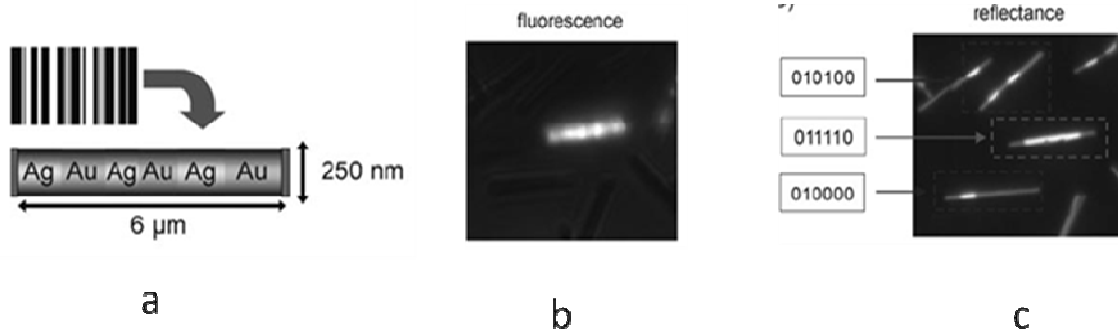
**Figure 42. Exemple d'un nanofilament de ZnO. Extrait de [98].**

Différents métaux tels que l'or, l'argent, le platine, le palladium ou encore le nickel peuvent être utilisés. Ces filaments présentent des propriétés optiques et électriques exploitables pour les bioanalyses.

En effet, les métaux qui composent les nanofilaments possèdent des réflectivités qui diffèrent et peuvent être utilisés en tant que code barres. Par définition, un code-barres est la représentation d'une donnée numérique sous forme d'un symbole constitué de barres et d'espaces. Les nanofilaments peuvent être composés de plusieurs métaux, prenons l'exemple d'un filament



composé d'or (Au) et d'argent (AG). l'Au et l'AG peuvent être déposés séquentiellement pour former des bandes. Si l'on attribue 0 à l'Au et 1 à l'AG on obtient un code binaire de 0 et de 1



**Figure 43. (a) Schéma montrant l'analogie entre un code barres conventionnel et un nanofilament composé de Au et de AG, dans ce cas le code obtenu est 101010. Image de fluorescence (b) et de réflectance (c) du nanofilament. Extrait de [99].**

L'exemple de la figure 43 est représentatif de ce type d'application, l'observation microscopique des filaments montre une succession de bandes dont la réflectance alternera en fonction du métal. Si deux métaux sont utilisés pour synthétiser des filaments à 10 bandes, il existe 528 possibilités de code barres. Le filament fait office de support sur lequel peuvent être greffés des Ac de capture. Une fois la cible capturée, un Ac secondaire marqué par une sonde fluorescente réagit avec la cible. Prenons l'exemple de la figure 43, trois filaments différents ont été synthétisés, le premier (010100) fonctionnalisé avec un Ac anti-BSA, le second (011110) fonctionnalisé avec un Ac anti-spore bactérienne, le troisième (010000) avec un Ac anti-ovalbumine. Les trois filaments sont mélangés avec les trois analytes (BSA, ovalbumine et spores) puis avec un Ac secondaire, spécifique de chacun des analytes, marqué par la même sonde fluorescente. Le multiplexage par fluorescence est possible mais ce dernier est rapidement limité par le recouvrement spectral des différentes sondes fluorescentes utilisables. Ici la fluorescence permet de repérer la présence de l'analyte sur l'image, mais c'est l'étude de la réflectance qui va permettre d'identifier le code barres et donc l'analyte capturé à la surface du filament, ici la spore bactérienne. D'autres travaux basés sur la même approche ont été développés pour le dosage d'Ac [100, 101]. L'une des limitations actuelle de cette approche est liée à la détection qui se fait par l'analyse et le traitement d'image prise au microscope ce qui peut se révéler assez long.

Les propriétés électriques des nanofilaments permettent elles de mesurer des variations en temps réel du signal électrique qui peuvent être reliées à des variations de concentrations de la cible. Les mesures sont basées sur les variations de conductance des filaments en fonction de leurs interactions avec la molécule cible. Dans le travail de Cui *et al.* [102], des nanofilaments de silice et de bore ont été recouverts de streptavidine dont l'affinité pour la biotine est très importante. Lorsqu'il y a interaction streptavidine-biotine, il y a modification des charges à la surface du filament ce qui a pour conséquence de modifier la conductance de ce dernier. Il y a une réponse linéaire entre la concentration de la cible et la conductance. Cette approche permet à la fois le multiplexage et la mesure de constantes d'affinités.

### VI.3°) Les nanoparticules d'oxyde de fer

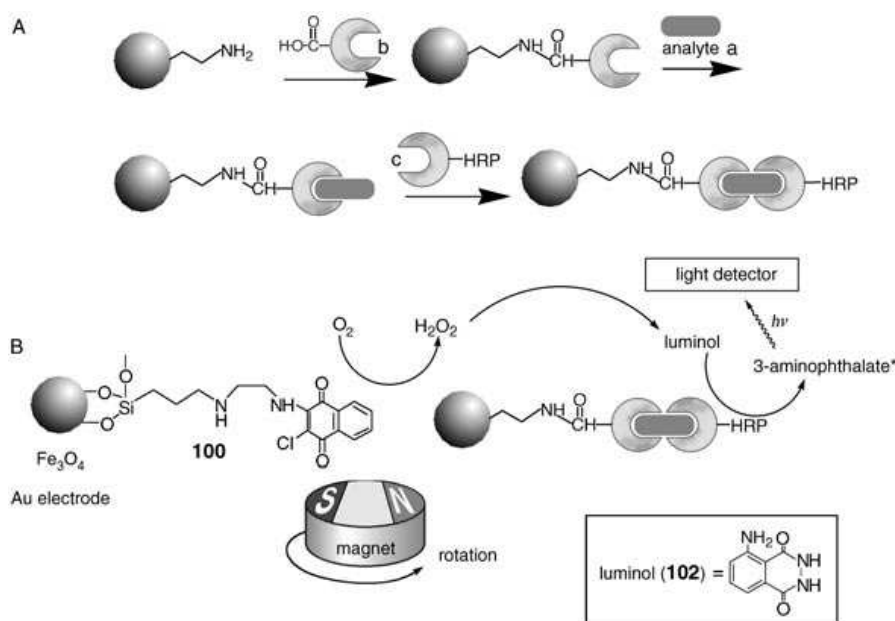
Ces nanoparticules sont largement utilisées pour leurs propriétés magnétiques. Ces propriétés magnétiques facilitent la séparation de la cible de sa matrice mais peuvent également servir à la détection. Leur synthèse sera décrite dans le chapitre 2. D'autres matériaux magnétiques peuvent être utilisés comme l'oxyde de gadolinium [103] ou le nickel [104]. L'oxyde de fer est plus répandu du fait de sa biocompatibilité.

La plupart des nanoparticules magnétiques appliquées aux immunoessais sont utilisées comme nanoplateforme facilitant la séparation du complexe et des formes libres par simple application d'un champ magnétique comme pour les billes de taille micrométrique. La surface des grains d'oxyde de fer est fonctionnalisable par des groupements chimiques (amine, acide, epoxy...) qui le plus souvent interagissent par simples interactions électrostatiques avec la surface de la nanoparticule.

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent donc être utilisées en tant que support de l'interaction Ag/Ac et la procédure analytique reste identique à celle observée pour les billes micrométriques [105]. Ici la réduction de la taille permet d'augmenter la surface spécifique et les propriétés de diffusion favorisent les interactions Ag/Ac. Voyons quelques exemples originaux développés à l'échelle nanométrique.

En plus de leur utilité dans la séparation des complexes et des formes libres, les propriétés magnétiques peuvent également favoriser les interactions entre molécules, la figure 44 en illustre un exemple [106]. Une nanoparticule d'oxyde de fer (10 nm) est fonctionnalisée par un Ac, ce dernier permet la capture de l'analyte qui réagit à son tour avec un Ac secondaire marqué par une enzyme

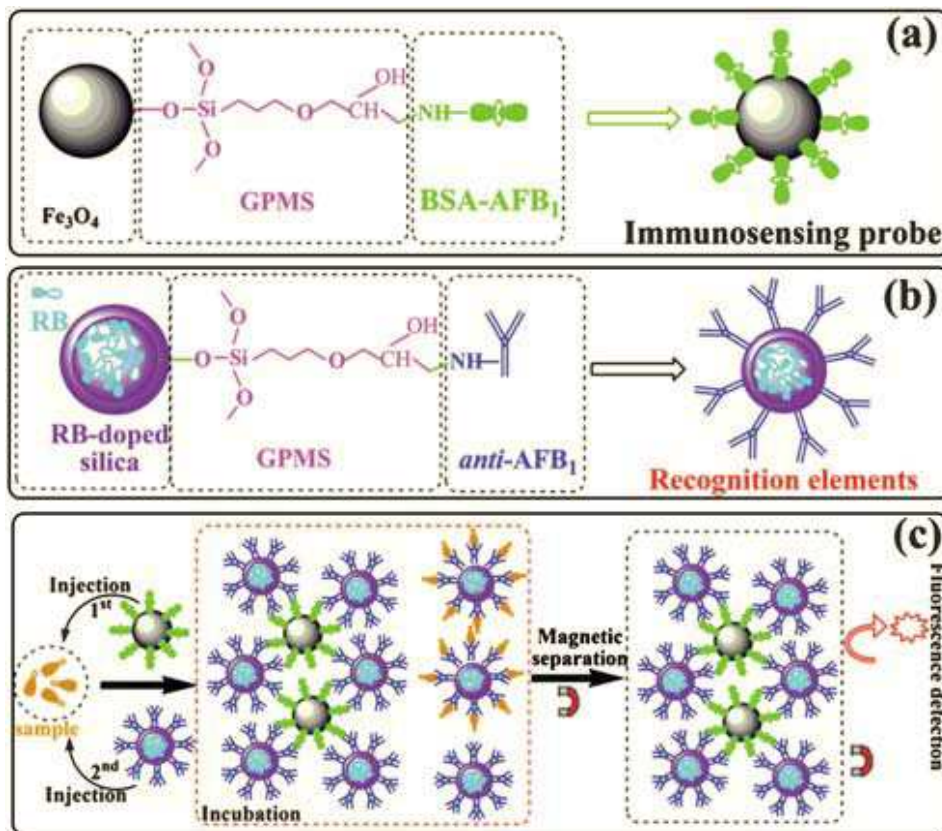
HRP. Après les étapes de rinçage sous champ magnétique, l'étape de détection fait appel aux propriétés catalytiques de l'HRP qui donne un produit luminescent en présence de  $H_2O_2$  produit par électrocatalyse à la surface d'un second type de nanoparticule fonctionnalisée par une molécule redox. La rotation de l'aimant induit la rotation des nanoparticules qui crée localement un courant convectif ce qui favorise l'interaction entre les espèces lors de l'étape de détection. Cette rotation magnétique permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 10 par rapport à un système statique et la limite de détection peut atteindre 50 pg/mL lors du dosage du dinitrophenyl. Notons que l'association de nanoparticules magnétiques et de l'HRP a également été développée pour le dosage d'aflatoxine dans le lait par détection électrochimique [107].



**Figure 44. (A) Fonctionnalisation de surface des nanoparticules et formation du sandwich après capture de l'analyte. (B) Amplification du signal par luminescence favorisée par la rotation des nanoparticules magnétiques. Extrait de [106].**

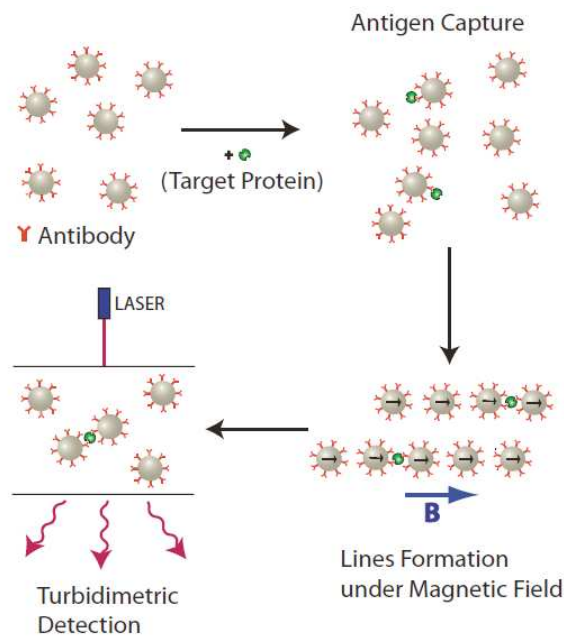
Dans cet exemple, les nanoparticules doivent rester colloïdales pour assurer la bonne réaction entre les espèces. Dans d'autres cas l'agglutination est recherchée [108]. L'immunoessai schématisé en figure 45 est de forme compétitive et fait intervenir ici deux types de nanoparticules par rapport aux techniques d'agglutination déjà évoquées précédemment qui n'en faisaient intervenir qu'un seul. L'une est magnétique, support de l'interaction et l'autre fluorescente est utilisée comme sonde de détection afin d'obtenir un treillis de nanoparticules qui forme des agglutinats. Ainsi la

nanoparticule magnétique peut être greffée avec la molécule cible commerciale (ici aflatoxine B1 ou AFB1). Une seconde nanoparticule de silice dont la coquille est dopée en fluorophore (Rhodamine B) est fonctionnalisée avec l'Ac anti AFB1. Lorsque ces deux nanoparticules sont mises en présence de la cible AFB1, il va y avoir compétition de l'Ac AFB1 pour la cible libre (à doser) de l'échantillon et la cible commerciale préalablement fixée sur la nanoparticule d'oxyde de fer. Les nanoparticules de silice qui n'ont pas réagi avec les particules d'oxyde de fer sont éliminées par application d'un champ magnétique. Plus la cible est concentrée, plus la nanoparticule de silice va interagir avec la cible et moins les agrégats de nanoparticules de fer et de silice seront formés. Le signal, issu des nanoparticules fluorescentes engagées dans l'agrégat avec les oxydes de fer, est inversement proportionnel à la concentration en AFB1. Cette approche présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, les analyses sont rapides (30 minutes) et la séquence est automatisable, mais la limite de détection (1 ng/mL) pourrait être améliorée par des techniques de préconcentration.



**Figure 45.** (a) Nanoparticule magnétique d'oxyde de fer fonctionnalisée avec la cible commerciale (AFB1). (b) Nanoparticule de silice dopée avec de la rhodamine B (RB) et fonctionnalisée avec l'Ac anti AFB1. (c) Principe de l'immunoessai au format compétitif. Extrait de [108].

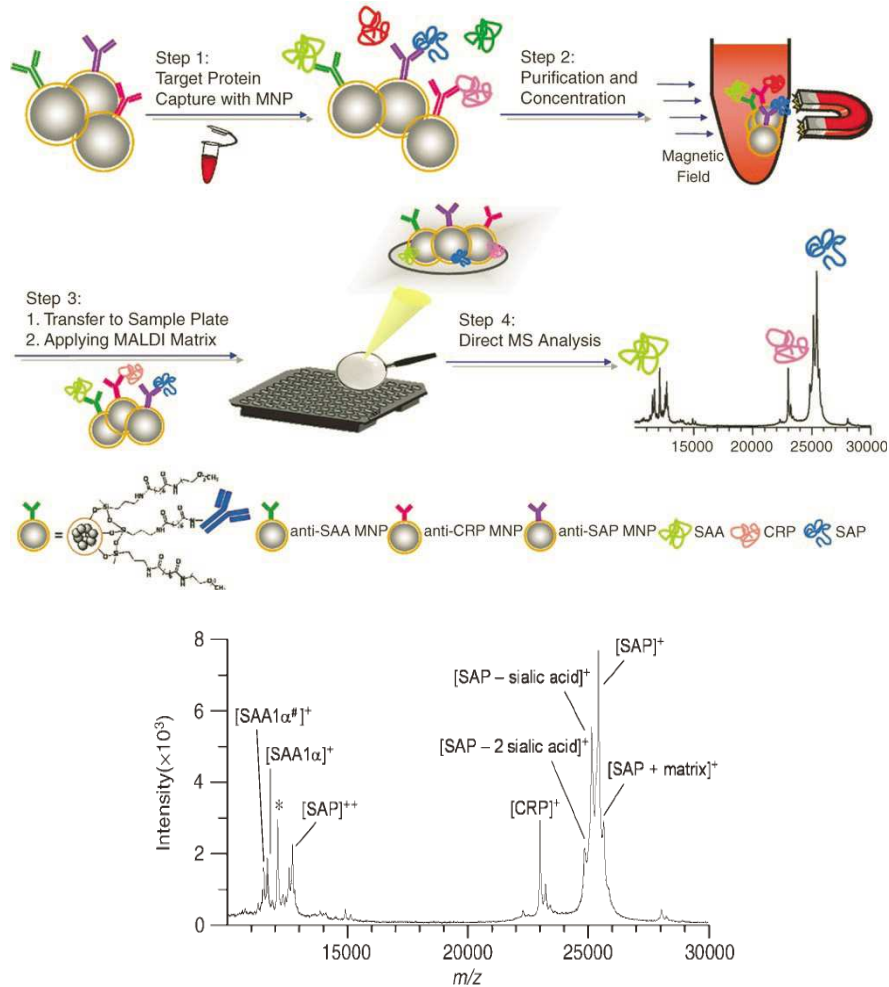
Dans l'exemple précédent, l'agglutination est passive. Les propriétés magnétiques des nanoparticules peuvent également permettre de faire une agglutination active ou forcée sous champ magnétique. Le groupe de Bibette [109] (Figure 46) a montré que cette agglutination forcée était accélérée. Dans un premier temps les nanoparticules sous forme colloïdale vont capturer la cible en solution, puis un champ magnétique externe est appliqué ce qui fait apparaître des dipôles magnétiques au sein des nanoparticules qui s'agencent spontanément sous forme de colonnes alignées selon le vecteur champ magnétique. Après quelques minutes le champ est supprimé, en l'absence de la cible, les nanoparticules se redispersent sous l'effet de l'agitation thermique, par contre si la cible est présente il y a formation de clusters détectés par des techniques de turbidimétrie. La sensibilité est augmentée d'un facteur 1000 probablement dû au fait que la force magnétique permet de franchir la barrière répulsive d'énergie d'interaction et que le temps de contact entre les partenaires immunologiques est plus long que dans un système où les collisions sont uniquement browniennes.



**Figure 46. Illustration du principe d'agglutination forcée sous champ magnétique. Extrait de [109].**

Comme nous l'avons vu pour les microsystèmes, le multiplexage est un paramètre de plus en plus recherché lors des bioanalyses. Dans l'exemple illustré figure 47, des oxydes de fer fonctionnalisés par des Ac de capture assurent la réaction spécifique avec les différentes cibles : SAA (serum amyloid A), SAP (serum amyloid P) et CRP (C-reactive protein). Cette étape permet de purifier et d'enrichir l'échantillon avant son analyse en MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser

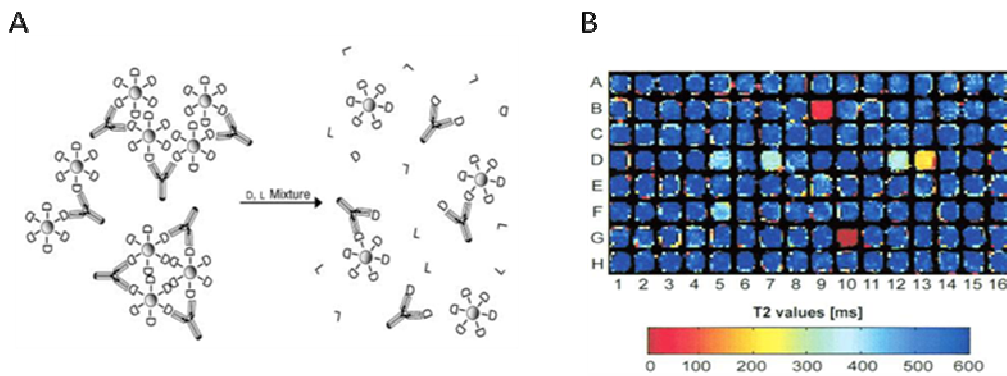
desorption/ionization time of flight mass spectrometry), cette approche MALDI permet d'ioniser des biomolécules sans les dégrader. Il y a ainsi une double spécificité lors de l'analyse, la première lors de la capture immunologique, la seconde lors de la détection dans le spectromètre de masse. Ainsi, les résultats illustrés figure 47 ont été obtenus sur un sérum dilué 100 fois et permettent de mettre en évidence les isoformes des protéines cibles avec une sensibilité avoisinant les 10 ng/mL après 1 heure d'analyse [110].



**Figure 47. Schéma analytique de l'immunoessai utilisant des nanoparticules magnétiques pour le multiplexage et profils des spectres des trois analytes obtenus par détection MALDI-TOF-MS sur 1 $\mu$ L de sérum dilué 100 fois. Extrait de [110].**

Enfin, un exemple basé sur le principe de RMN est illustré figure 48, dans ce cas les nanoparticules magnétiques sont utilisées en tant que support de l'interaction et système de détection. L'imagerie par résonance magnétique consiste à mesurer les temps de relaxation des spins de l'eau. Le temps

de relaxation T2 (composante perpendiculaire au champ magnétique appliqué  $B_0$ ) reflète le temps que va mettre un spin pour revenir à son état d'équilibre. L'agitation moléculaire et le milieu environnant vont influencer sur le temps de relaxation T2 des molécules d'eau. Ainsi, le temps de relaxation dans un liquide biologique comme l'eau ou dans les os est différent ce qui permet l'imagerie médicale. Des immunoessais basés sur ce principe ont été développés [111,112]. Les nanoparticules magnétiques libres favorisent le déphasage des spins atomiques de l'eau et augmentent le temps de relaxation de ces derniers. En revanche, dès que les nanoparticules sont sous forme d'agrégats, le temps de relaxation des spins de l'eau avoisinante diminue. Lors de l'agrégation, il y a moins d'interface entre les nanoparticules et l'eau, donc une plus faible interaction entre spin des protons de l'eau et ceux des atomes de fer.



**Figure 48. (A) Principe de l'immunoessai en phase homogène pour le dosage d'énantiomères L phénylalanine ou D phénylalanine. (B) Cartographie du temps de relaxation T2 en fonction de la présence d'agrégats de nanoparticules reflétant la présence de la cible. Extrait de [111,112].**

A l'aide d'un imageur à résonance magnétique, la variation de T2 peut être imagée et cartographiée au sein d'une plaque de microtitration (Figure 48B). La formation de clusters de nanoparticules magnétiques résultant de la présence de la cible va entraîner une diminution du temps de relaxation T2 proportionnelle à la concentration de la cible. Cette technique de détection permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps mais nécessite l'utilisation d'un appareillage spécifique, couteux et encombrant pour atteindre des sensibilités peu élevées de l'ordre du  $\mu\text{g/mL}$ .

Notons que Philips a commercialisé un support miniaturisé (Magnotech) utilisant des nanoparticules magnétiques dédiées au dosage de biomarqueurs cardiaques, ici les nanoparticules magnétiques sont utilisées en tant que support de capture puis sont ensuite immobilisées sur une surface avant d'être détectées par des techniques optiques.

Les nanoparticules à base d'oxyde de fer présentent des propriétés physico-chimiques qui permettent de développer des immunoessais performants. Le premier atout est lié à la taille nanométrique et à l'aspect colloïdal qui favorisent la diffusion des molécules d'intérêt. La seconde propriété exploitée est le caractère magnétique qui facilite la séparation des complexes et des formes libres. Ce sont ces propriétés qui nous ont amenés à développer une nanoplatforme présentant ces caractéristiques de diffusion et de magnétisme.



## Références bibliographiques

- [1] F.-X. Desvaux, J. Daussant *Génie immunologique : de la théorie à la pratique*, **2007**, UPMC.
- [2] Moneret-Vautrin, D. A., *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **2008**, 48, 171-178.
- [3] Mondoulet, L., *Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs*, Thèse de doctorat, INSA ,Toulouse **2005**.
- [4] O. Ouchterlony, *Acta Pathol Microbiol Scand* **1949**, 26, 507-515.
- [5] G. Mancini, A. O. Carbonara, J. F. Heremans, *Immunochemistry* **1965**, 2, 235-254.
- [6] C. B. Laurell *Anal Biochem* **1966**, 15, 45-52.
- [7] S. V. Boyden *J. exp Med* **1951**, 93, 107-120.
- [8] J. M. Singer, C.M. Plotz *AM J Med* **1956**, 21, 888-892.
- [9] D. Riochet, RF Masseyeff, WH Albert, NA Staines, *Methods of immunological analysis*, **1993**, 1, 203-214.
- [10] E. Engvall, P. Perlman *Immunochemistry* **1971**, 9, 871-874.
- [11] <http://www.phadia.com>
- [12] [http:// www.lsvet.com](http://www.lsvet.com)
- [13] S. Cui, S. Zhou, C. Chen, T. Qi, C. Zhang, J. Oh *Journal of Virological Methods* **2008**, 152, 38-42.
- [14] M. Pattarawarapan, S. Nangola, T. R. Cressey, C. Tayapiwatana *Talanta* **2007**, 71,462–470.
- [15] P. Sithigorngul, S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, P. Suksawat, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul *Journal of Microbiological Methods* **2007**, 71 256–264.
- [16] B.-H. Liu, Z.-J. Tsao, J.-J. Wang, F.-Y. Yu *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7029–7035.
- [17] C. Shi, S. Zhao, K. Zhang, G. Hong, Z. Zhu *Journal of Environmental Sciences* **2008** 1392–1397.
- [18] J. H. Kang, D. H. Kwon, T. W. Chung, Y. D. Kim, H. G. Lee, J. W. Kim, I. S. Choe, K.-W. Kim, J. S. Lim, E. Y. Song, C.-H. Kim *Journal of Virological Methods* **2007**, 146, 74–79.
- [19] P.Thébault, S. Boujday, H.Sénéchal, C.-M. Pradier *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10612–10619.

- [20] R. Gutiérrez-Gallego, J. Bosch, G. Such-Sanmartín, J. Segura *Growth Hormone & IGF Research* **2009**, 388–398.
- [21] H. E. Indyk *international dairy journal* **2008** 1-7.
- [22] L. Tao, C. A. Aspinwall, R. T. Kennedy *Electrophoresis*, **1998**, 19, 403-408.
- [23] I. German, D. D. Buchanan, R. T. Kennedy *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4540-4545.
- [24] I. German, R. T. Kennedy *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5365-5372.
- [25] N. Chiem, D. J. Harrison *Anal. Chem.* **1997**, 69, 373-378.
- [26] E. M. Abad-Villar, J. Tanyanyiwa, M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, P. C. Hauser *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1282-1288.
- [27] J. Wang, J. Ren *Electrophoresis* **2005**, 26, 2402–2408.
- [28] G. Wang, K. Huynh, R. Barhate, W. Rodrigues, C. Moore, C. Coulter, M. Vincent, J. Soares *Forensic Science International* **2010**.
- [29] V. Doná *Journal of Immunological Methods* **1985**, 82, 65-75.
- [30] H. Park, M. Lee, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, J. Y. Park, S. Lee, K.-H. Lee, Y.-W. Choi *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, 29, 1297.
- [31] Y. Xu, D. W. Piston, C. H. Johnson *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 151–156.
- [32] J. F. Crespo, J. M. James, J. Rodriguez *Molecular Nutrition & Food Research* **2004**, 48, 347-355.
- [33] H. Chardin, M. Raulf-Heimsoth, Z. Chen, H. P. Rihs, C. Mayer, F. X. Desvaux, H. Sénéchal, G. Peltre *International Archives of Allergy and Immunology* **2002**, 128, 195-203.
- [34] S. C. Terry, J. H. Jerman, J. B. Angell *IEEE Trans. Electron Devices* **1979**, 26, 1880-1886.
- [35] S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1114-1118.
- [36] D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H. M. Widmer *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1926-1932.
- [37] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer *Sensors and Actuators B* **1990**, 1, 244-248.
- [38] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2000**, 21, 27-40.
- [39] T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3373-3386.
- [40] P. S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3887-3908.

- [41] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*, Belin, Paris, France 2003.
- [42] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 34-54.
- [43] Graf, M., García, R. G., Wätzig, H., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2409-2417.
- [44] Swinney, K., J., B. D., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 613-620.
- [45] A. T. Pereira, P. Novo, D. M. F. Prazeres, V. Chu, J. P. Conde *Biomicrofluidics* **2011**, *1*, 014102.
- [46] T. G. Henares, F. Mizutani, H. Hisamoto *analytica chimica acta*, **2008**, *611* 17–30.
- [47] O. Hofmann, G. Voirin, P. Niedermann, A. Manz *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5243-5250.
- [48] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides *SCIENCE* **2002**, *295*, 25.
- [49] J. P. Golden , T. M. Floyd-Smith , D. R. Mott , F. S. Ligler *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *2763–2767*.
- [50] V. N. Morozov, S. Groves, M. J. Turell, C. Bailey *J. AM. CHEM. SOC.* **2007**, *129*, 12628-12629.
- [51] A. Bernard, B. Michel, E. Delamarche, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 8-12.
- [52] S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger, E. Delamarche *LabChip* , **2004**, *4*, 563-569.
- [53] V. Studer, A. Pépin, Y. Chen, A. Ajdari *Analyst* **2004**, *129* , 944–949.
- [54] M.A. Unger, H.P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake *Science*, **2000**, *288*, 113-116.
- [55] Kong, L. Jiang, X. Su, J. Qin, Y. Du, B. Lin *Lab Chip*, **2009**, *9*, 1541–1547.
- [56] Lai, S., Wang, S., Luo, J., Lee, L. J., Yang, S.-T., Madou, M. J., *Anal. Chem.* 2004, *76*, 1832-1837.
- [57] B. S. Lee, Y. U. Lee, H.-S. Kim, T.-H. Kim, J. Park, J.-G. Lee, J. Kim, H. Kim, W. G. Lee, Y.-K. Cho *Lab Chip*, **2011**, *11*, 70-78.
- [58] M. Ikami, A. Kawakami, M. Kakuta, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba *Lab Chip*, **2010**, *10*, 3335-3340.
- [59] C. A. Marquette, D. Thomas, A. Degiuli, L. J. Blum *Anal Bioanal Chem* **2003**, *377*, 922–928.
- [60] Sato, K., Tokeshi, M., Kimura, H., Kitamori, T., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 1213-1218.

- [61] H. Miyaguchi, H. Takahashi, T. Ohashi, K. Mawatari, Y. T. Iwata, H. Inoue, T. Kitamori *Forensic science international* **2009**, 184, 1-5.
- [62] A.-L. Gassner, M. Abonnenc, H.-X. Chen, J. Morandini, J. Jossierand, J. S. Rossier, J.-M. Busnel and H. H. Girault *Lab Chip*, **2009**, 9, 2356-2363.
- [63] P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J.-L. Viovy *SCIENCE*, **2002**, 295, 2237.
- [64] F. Lacharme, C. Vandevyver, M. A. M. Gijs *Microfluid Nanofluid* **2009**, 7, 479–487.
- [65] S. A. Peyman, A. Iles, N. Pamme *Lab Chip*, **2009**, 9, 3110–3117.
- [66] A. W. Martinez, S.T. Phillips, B. J. Wiley, M. Gupta, G. M. Whitesides, *Lab Chip*, **2008**, 8, 2146-2150.
- [67] C.-M. Cheng, A. W. Martinez, J. Gong, C. R. Mace, S. T. Phillips, E. Carrilho, K. A. Mirica, G. M. Whitesides *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 4771 –4774.
- [68] M. S. Chiriaco, E. Primiceri, E. D. Amone, R. E. Ionescu, R. Rinaldi, G. Maruccio *Lab Chip*, **2011**, 11, 658-663.
- [69] L. B. Koutny, D. Schmalzing, T. A. Taylor, M. Fuchs *Anal. Chem.* **1996**, 68, 18–22.
- [70] T. M. Phillips, E. F. Wellner *Electrophoresis* **2007**, 28, 3041–3048.
- [71] A. Bromberg, R. A. Mathies *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1188–1195.
- [72] J. Wang, A. Ibanez, M. P. Chatrathi, A. Escarpa *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5323-5327.
- [73] J. F. Dishinger, K. R. Reid, R. T. Kennedy *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 3119–3127.
- [74] T. Kawabata, H. G. Wada, M. Watanabe, S. Satomura *Electrophoresis* **2008**, 29, 1399–1590.
- [75] A. E. Herr, A. V. Hatch, D. J. Throckmorton, H. M. Tran, J. S. Brennan, W. V. Giannobile, A. K. Singh *PNAS*, **2007**, 104, 5268–5273.
- [76] D. S. Reichmuth, S. K. Wang, L. M. Barrett, D. J. Throckmorton, W. Einfeld, A. K. Singh, *Lab Chip*, **2008**, 8, 1319-1324.
- [77] B. He, N. Tait, F. Regnier *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3790-3797.
- [78] T.-K. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3316-3321.
- [79] T.-K Lim, T. Matsunaga *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, 16, 1063-1069.
- [80] T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba *Lab Chip*, **2009**, 9, 966.
- [81] R. F. Renzi, J. Stamps, B. A. Horn, S. Ferko, V. A. VanderNoot, J. A. A. West, R. Crocker, B. Wiedenman, D. Yee, J. A. Fruetel *Anal. Chem.* **2005**, 77, 435-441.

- [82] G. Steiner *Anal Bioanal Chem* **2004**, 379, 328–331.
- [83] Y. Luo, F. Yu, R. N. Zare *Lab Chip*, **2008**, 8, 694.
- [84] V. Kanda, J. K. Kariuki, D. J. Harrison, M. T. McDermott *Anal. Chem.* **2004**, 76, 7257–7262.
- [85] R. Kurita, Y. Yokota, Y. Sato, F. Mizutani, O. Niwa *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5525–5531.
- [86] G. Krishnamoorthy, E. T. Carlen, D. Kohlheyer, R. B. M. Schasfoort, A. van den Berg *Anal. Chem.* **2009**, 81, 1957–1963.
- [87] F. Destremaut, J.-B. Salmon, L. Qi, J.-P. Chape *Lab Chip*, **2008**, 8, 950–957.
- [88] R. S. Gaster, D. A. Hall, S. X. Wang, *Lab Chip*, **2011**, 11, 950.
- [89] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian *Biomaterials* **2007**, 4717–4732.
- [90] B. V. Enustun, J. Turkevich, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3317.
- [91] X. Liu, Q. Dai, L. Austin, J. Coutts, G. Knowles, J. Zou, H. Chen, Q. Huo *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2780–2782.
- [92] B. Du, Z. Li, Y. Cheng *Talanta*, **2008**, 75, 959–964.
- [93] S. Mayilo, M. A. Kloster, M. Wunderlich, A. Lutich, T. A. Klar, A. Nichtl, K. Krzinger, F. D. Stefani, J. Feldmann *Nano Lett.* **2009**, 12, 4558–4563.
- [94] Z. Peng, Z. Chen, J. Jiang, X. Zhang, G. Shen, R. Yu *Analytica Chimica Acta* **2007**, 583, 40–44.
- [95] M. Moskovits *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 485–496.
- [96] H. Chon, S. Lee, S. W. Son, C. Hwan Oh, J. Choo *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 3029–3034.
- [97] L. A. Lyon, M. D. Musick, M. J. Natan *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5177–5183.
- [98] C. R. Martin, *Science*, **1994**, 266, 1961–1966.
- [99] J. B.-H. Tok, F. Y. S. Chuang, M. I. C. Kao, K. A. Rose, S. S. Pannu, M. Y. Sha, G. Chakarova, S. G. Penn, G. M. Dougherty *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6900–6904.
- [100] S. R. Nicewarner-Peña, A. J. Carado, K. E. Shale, C. D. Keating *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7360–7367.
- [101] S. R. Nicewarner-Peña, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan *SCIENCE*, **2001**, 294, 137–141.
- [102] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C. M. Lieber *SCIENCE* **2001**, 293, 1289–1292.

- [103] J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J.-L. Coll, L. V. Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5076–5084.
- [104] P. Zhang, F. Zuo, F. K. Urban, A. Khabari, P. Griffiths, A. Hosseini-Tehrani *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2001**, 225, 337–345.
- [105] M. Tadashi, M. Yoshiaki, Y. Tomoko, T. Haruko, T. Masaaki, G. Harumi, A. Junko, T. Hideji *Analytica chimica acta* **2007**, 597, 331-339.
- [106] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner *J. Am. Chem. Soc* **2003**, 125, 3452-3454.
- [107] N. Paniel, A. Radoi, J.-L. Marty *Sensors* **2010**, 10, 9439-9448
- [108] D. Tang, Y. Yu, R. Niessner, M. Miró, D. Knopp *Analyst*, **2010**, 135, 2661-2667.
- [109] J. Baudry, C. Rouzeau, C. Goubault, C. Robic, L. Cohen-Tannoudji, A. Koenig, E. Bertrand, J. Bibette *PNAS*, **2006**, 103, 16076–16078.
- [110] P.-C. Lin, P.-H. Chou, S.-H. Chen, H.- K. Liao, K.-Y. Wang, Y. J. Chen, C.- C. Lin *small* **2006**, 2, 485- 489.
- [111] A. Tsourkas, O. Hofstetter, H. Hofstetter, R. Weissleder, L. Josephson *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2395 –2399.
- [112] D. Högemann, V. Ntziachristos, L. Josephson ,R. Weissleder *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 116-121.



# **CHAPITRE 2 :**

## **SYNTHESE, CARACTERISATION ET FONCTIONNALISATION DE LA NANOPLATEFORME DE TYPE CŒUR-COQUILLE SUPPORT DE L'IMMUNOESSAI**

### **I°) Introduction**

Comme indiqué précédemment, ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet SOLUDIAG (ANR blanche) et a pour objectif le développement d'un microsystème bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques et dédié au diagnostic de l'allergie.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre bibliographique, les immunoessais en phase hétérogène peuvent être largement limités par la diffusion des espèces réactives. Les immunoessais en phase homogène sont quand à eux limités par des problèmes liés à la séparation du complexe et des formes libres lorsque l'analyse se déroule en CE, ces étapes se trouvent simplifiées dans le format hétérogène. L'objectif de notre étude a été de développer une plateforme qui permette la diffusion des partenaires immunologiques en solution et facilite la séparation des complexes et des formes libres. Notre choix de la plateforme s'est porté sur des nanoparticules colloïdales de type cœur-coquille (NPCC), dont le cœur d'oxyde de fer magnétique est encapsulé dans une coquille de silice à la surface de laquelle sera greffée la molécule de capture.

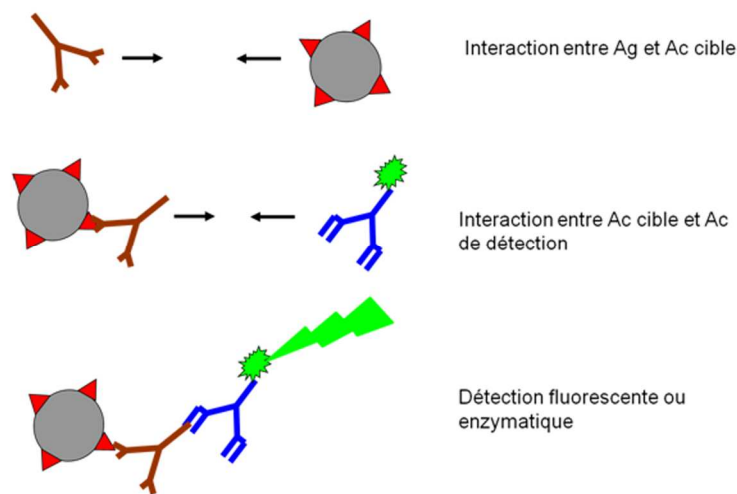
Les NPCC offrent plusieurs avantages :

- Leur nature colloïdale assure une interaction entre l'Ag et l'Ac en solution ce qui pourrait améliorer l'efficacité de capture et les cinétiques d'interaction.
- La chimie de surface peut être modifiée à façon ce qui jouera un rôle sur la spécificité du signal obtenu lors de l'analyse.
- Enfin les propriétés magnétiques permettent des étapes de séparation et de rinçage.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à la synthèse, la fonctionnalisation et la caractérisation de NPCC utilisées en tant que support de l'immunoessai comme illustré en figure 1. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'une des approches possibles concernant le diagnostic de



l'allergie repose sur l'identification et la quantification des IgE circulantes dans le serum des patients. Dans le cas de l'allergie au lait nous nous sommes intéressés à l'un des allergènes majeurs : l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -Lac). Le diagnostic repose alors sur l'identification et la quantification des IgE du patient dirigées contre cet allergène. Pour cela les NPCC ont été greffées avec l' $\alpha$ -lac afin de pouvoir spécifiquement capturer les IgE anti- $\alpha$ -Lac. Ces dernières seront quantifiées à l'aide d'un second Ac marqué par une enzyme ou un fluorophore durant l'étape de détection.



**Figure 1. Schéma réactionnel de l'immunoessai utilisant des nanoparticules magnétiques en tant que support de l'interaction.**

Nous nous intéresserons dans un premier temps à la synthèse de ces NPCC puis à leur caractérisation en termes de taille, de charge et de magnétisme. L'étape suivante a consisté à greffer l'allergène (molécule de capture) à la surface de la NPCC dont l'optimisation a été effectuée par des approches chimiométriques.

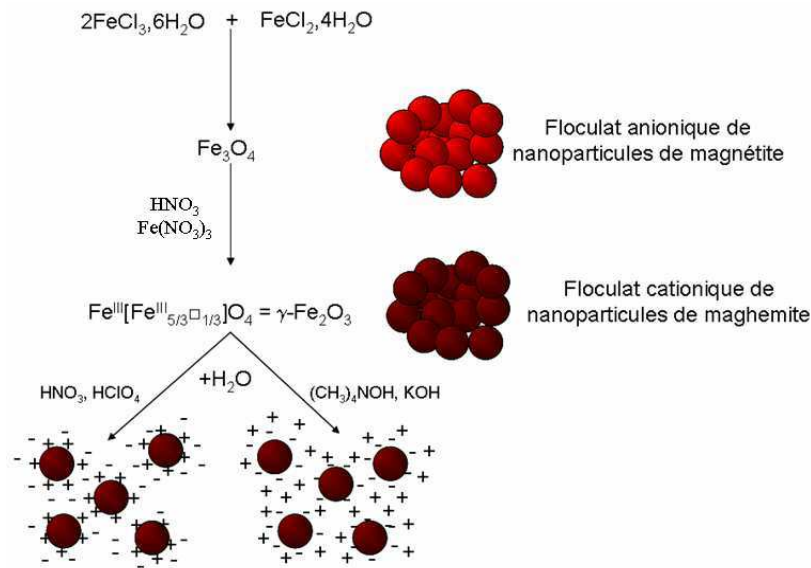
## II°) Synthèse des nanoparticules cœur-coquille

Les NPCC ont été synthétisées en suivant le protocole développé par Thomas Georgelin au cours de sa thèse [1]. Ces NPCC sont synthétisées de façon séquentielle, la première étape consiste à élaborer le cœur magnétique, la seconde étape consiste en l'encapsulation du cœur magnétique dans une coquille de silice (Annexes 1 et 2).

### II.1°) Synthèse du cœur magnétique d'oxyde de fer

Le cœur magnétique de notre nanoplateforme est un oxyde de fer de maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  issu de l'oxydation totale de la magnétite colloïdale  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Il existe différentes approches de synthèse de cet oxyde de fer : le broyage mécanique [2,3], le traitement par voie hydrothermale [4], la synthèse en microémulsion [5], la synthèse par décomposition thermique [6], la synthèse par voie polyol [7] et la coprécipitation alcaline de sels métalliques [8].

La synthèse mise en œuvre au cours de notre projet est basée sur la coprécipitation alcaline de sels de Fer II et de Fer III, méthode maîtrisée depuis de nombreuses années dans notre laboratoire (procédé Massart [8]) et schématisée en figure 2. Un mélange de sels ferriques et ferreux sont oxydés et vont se polycondenser pour former des précurseurs ( $\text{Fe}_2(\text{OH})_4$  et  $\text{Fe}_3(\text{OH})_6$ ) après l'ajout d'une base. Des premiers germes de magnétite apparaissent et par croissance vont donner des particules dont la taille finale dépendra des conditions opératoires : temps de synthèse, pH, température, concentration en précurseurs...

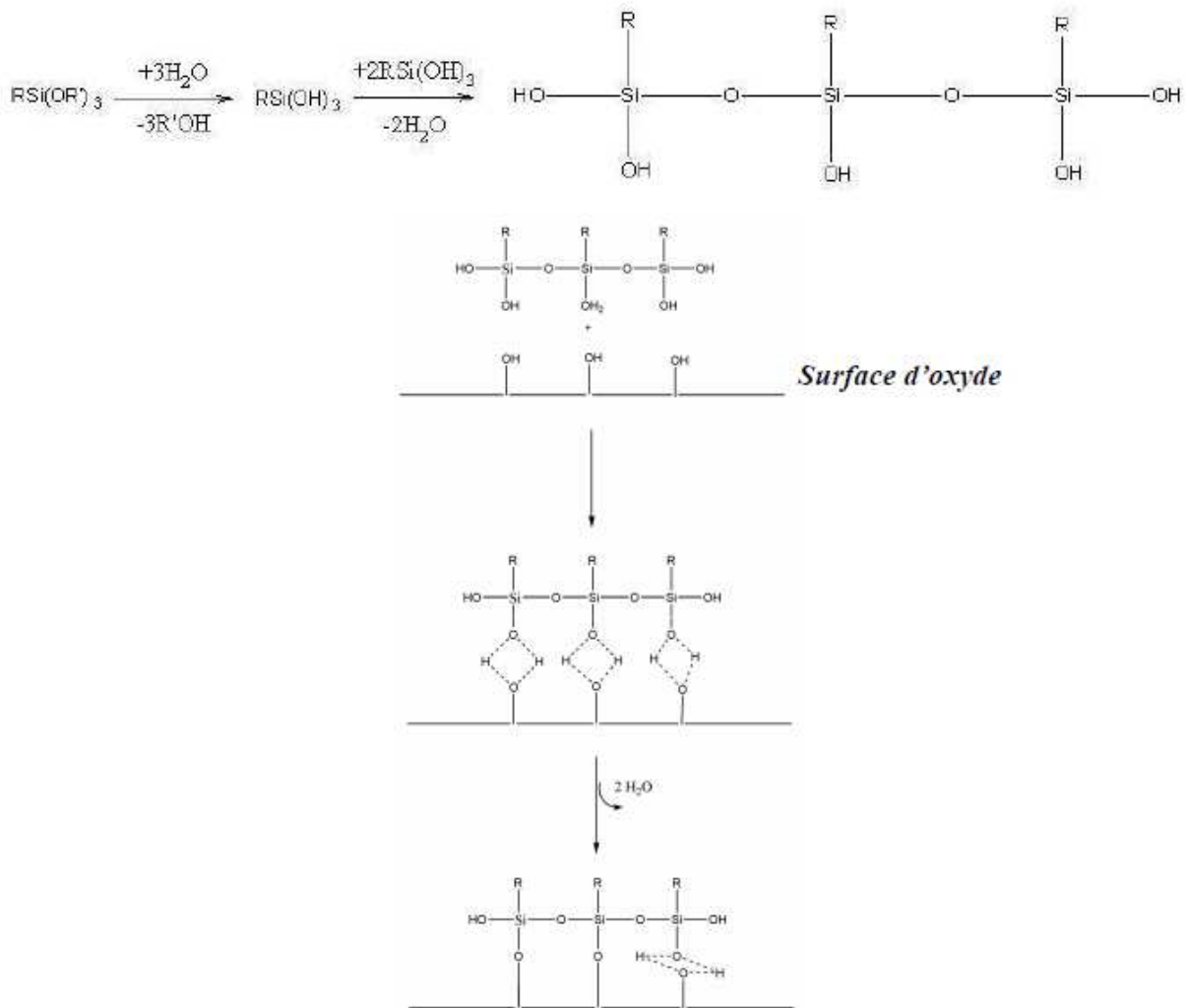


**Figure 2. Représentation schématique de la synthèse des nanoparticules de maghémite, d'après S. Mornet [9].**

Les particules de magnétite sont ensuite oxydées en milieu acide pour donner des particules de maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . La charge de surface de ces objets est positive, ce qui implique que ces nanoparticules d'oxyde de fer offrent une stabilité colloïdale par répulsion électrostatique lorsqu'elles sont dispersées dans un milieu acide (pH 3). Or de nombreuses applications se font en milieu biologique à pH 7, à ce pH les particules de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sont proches de la neutralité et s'agrègent. Une fonctionnalisation de leur surface par des ligands organiques comme l'acide citrique a été développée pour stabiliser ces nanoparticules à pH 7, leur charge globale devient négative. On obtient ainsi des particules de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  citratées qui seront par la suite encapsulées dans une coquille de silice. Ces particules, très largement étudiées pour les applications biomédicales, ont été naturellement choisies comme matériaux de base pour la synthèse des particules de type cœur-coquille. De plus, le citrate permet de favoriser l'encapsulation de la maghémite dans la coquille de silice.

## II.2°) Formation de la coquille de silice

L'encapsulation des grains d'oxyde de fer dans une couche de silice est largement développée pour des applications biologiques [10,11] et analytiques comme nous l'avons vu dans le premier chapitre. Cette couche de silice protège le cœur magnétique d'oxyde de fer de la lixiviation et de la complexation des atomes de surface. La couche de silice est également fonctionnalisable par de nombreux groupements chimiques [12, 13] (amine, acide, thiol, epoxy...) dédiés au greffage d'entités biologiques. Il existe deux approches différentes pour la synthèse de cette coquille de silice : le procédé en microémulsion [14, 15] et le procédé sol-gel [16-19] pour lequel nous avons opté. La démarche suivie est celle décrite par Stöber [20].



**Figure 3. Etapes d'hydrolyse et de condensation d'un alcoxysilane à la surface d'un oxyde métallique, extrait de [9].**

Un monomère de silice, l'alkoxysilane  $\text{RSi}(\text{OR})_3$ , est tout d'abord hydrolysé en fonctions silanols qui vont par la suite se condenser pour former des ponts siloxanes et une première couche de silice (Figure 3). Les silanols restant de la couche de silice interagissent avec les groupements hydroxyles de l'oxyde de fer pour former des ponts siloxanes. Ainsi, les grains de maghémite sont enrobés d'une couche de silice. La formation de cette couche peut être initiée en milieu acide ou basique. Notre choix s'est porté sur un milieu alcalin au sein duquel l'étape de condensation est plus rapide que l'étape d'hydrolyse, il se forme donc des germes de silice par nucléation qui viennent ensuite se condenser autour du grain d'oxyde de fer. Cette approche permet d'obtenir des couches plus épaisses qu'en milieu acide. L'épaisseur de la couche ne dépend pas seulement du pH mais aussi du solvant et de la quantité initiale d'organosilane.

### II.3°) Fonctionnalisation chimique de la surface des nanoparticules cœur-coquille

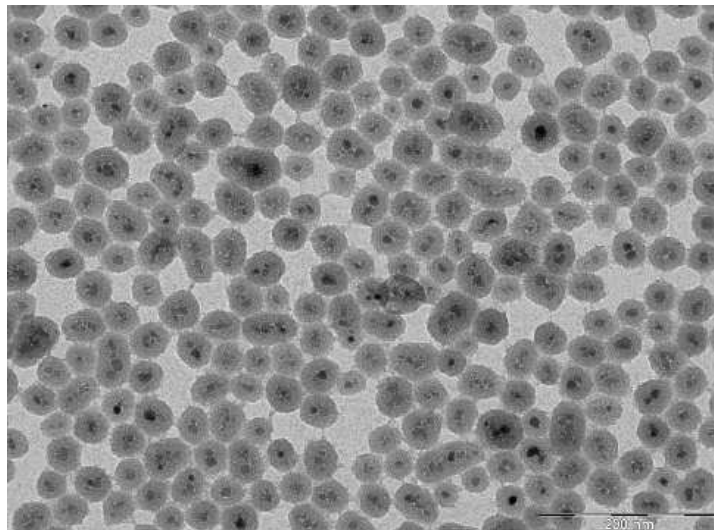
Une fois la coquille de silice formée, sa surface a été fonctionnalisée par du polyéthylèneglycol (PEG) en utilisant du 2-[methoxy(PolyEthyleneOxy)propyl]trimethoxySilane (PEOS) et par des fonctions amines ( $\text{NH}_2$ ) en utilisant du 3-AminoPropylTriethoxySilane (APTS). Ces deux organosilanes, suite à leur hydrolyse en milieu aqueux, vont réagir avec la surface de la silice de manière covalente. Le PEG a pour fonction de stabiliser les NPCC en solution en évitant leurs interactions par répulsion stérique, il limite également l'adsorption non spécifique des biomolécules à la surface des NPCC et favorise leur caractère furtif pour les applications *in vivo*. Les groupements amines permettent le greffage covalent de biomolécules et confèrent une charge de surface aux NPCC ce qui favorise leur répulsion électrostatique. Huit types différents de NPCC ont été synthétisés en faisant varier le rapport molaire APTS/PEOS (de 0,25 à 1,75) durant la synthèse afin d'améliorer la spécificité de l'analyse comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Notons qu'il est également possible de synthétiser des NPCC fluorescentes en dopant la coquille de silice avec un fluorophore (FITC ou RITC). Au final ces NPCC sont mises en suspension dans un tampon MOPS de pH 7,5 et de force ionique de 10 mM. Au sein de ce tampon, les nanoparticules conservent leur caractère colloïdal pendant plusieurs mois sans jamais s'agréger.

### III°) Caractérisation des nanoparticules cœur-coquille

Ce type de synthèse nous a au final permis d'obtenir des objets colloïdaux, magnétiques et dont la chimie de surface était ajustable selon les besoins. Dans un deuxième temps nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation de ces objets en termes de taille, de magnétisme et de charge de surface. Les deux premiers paramètres furent évalués par Thomas Georgelin au cours de sa thèse.

#### III.1°) Mesure de la taille

La mesure de la taille physique et hydrodynamique est primordiale pour s'assurer du caractère colloïdal des objets et de vérifier leur état d'agrégation. Les NPCC obtenues ont été observées en microscopie électronique à transmission (TEM) afin d'évaluer leur diamètre physique (Figure 4). En moyenne 2 à 3 grains d'oxyde de fer d'une taille de 7 nm sont encapsulés dans une coquille de silice mesurant environ 12 nm d'épaisseur. Le diamètre physique déterminé par TEM est de  $34 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ . Les objets obtenus sont de forme sphérique et sont homogènes en taille ce qui, pour les applications futures, devrait assurer une bonne reproductibilité des expériences.



**Figure 4. Image de microscopie électronique à transmission de nanoparticules de maghémite recouvertes d'une couche épaisse de silice par synthèse Stöber.**

Le diamètre hydrodynamique a ensuite été mesuré par des techniques de diffusion de la lumière (DLS). Le diamètre hydrodynamique mesuré est de  $40 \pm 1 \text{ nm}$ . Cette mesure montre que les nanoparticules en solution (dans les conditions de pH et de force ionique choisies) restent individuelles les unes par rapport aux autres et ne forment pas d'agrégats.

### III.2°) Propriétés magnétiques

Nous aborderons brièvement les notions de magnétisme ici, plus de détails seront apportés dans le chapitre 4.

Les NPCC contiennent un cœur d'oxyde de fer qui présente des caractéristiques de superparamagnétisme. Chacun des grains de maghémite est composé d'un monodomaine ce qui signifie que l'ensemble des moments magnétiques à l'échelle atomique s'orientent dans la même direction. Sans champ extérieur, chacun des grains d'oxyde de fer est caractérisé par un vecteur moment magnétique (somme de l'ensemble des moments magnétiques atomiques) qui s'oriente de façon aléatoire, le moment magnétique « tourne » à l'intérieur du grain. Ceci est dû à l'agitation thermique de ces particules. Il en résulte une aimantation nulle à l'échelle micro et macroscopique. En revanche, lorsque ces objets sont soumis à un champ extérieur permanent, tous les moments vont s'aligner dans une même direction parallèle à celle du champ extérieur. On dit que les grains d'oxyde de fer s'aimantent. Plus le champ externe appliqué augmente, plus le nombre de vecteurs moments magnétiques parallèles les uns aux autres augmente jusqu'à saturation. On parle alors d'aimantation à saturation. Une fois que le champ extérieur est supprimé, les grains de maghémite perdent leur aimantation et tous les moments magnétiques s'orientent de façon aléatoire.

Chaque NPCC est composée en moyenne de trois grains d'oxyde de fer, elles possèdent donc trois moments magnétiques indépendants.

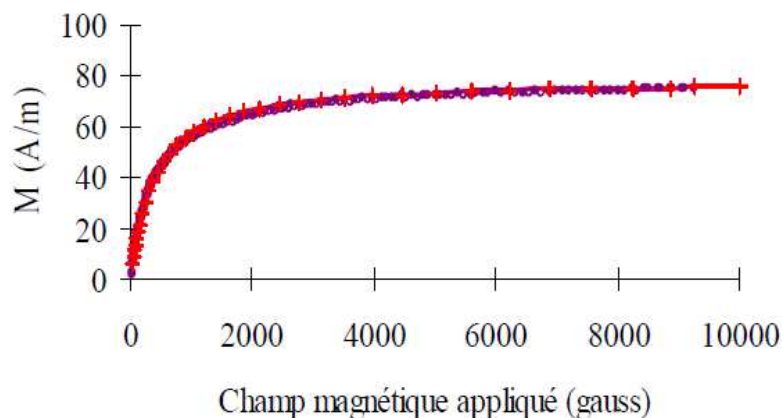


Figure 5. Courbe d'aimantation de nanoparticules cœur coquille.

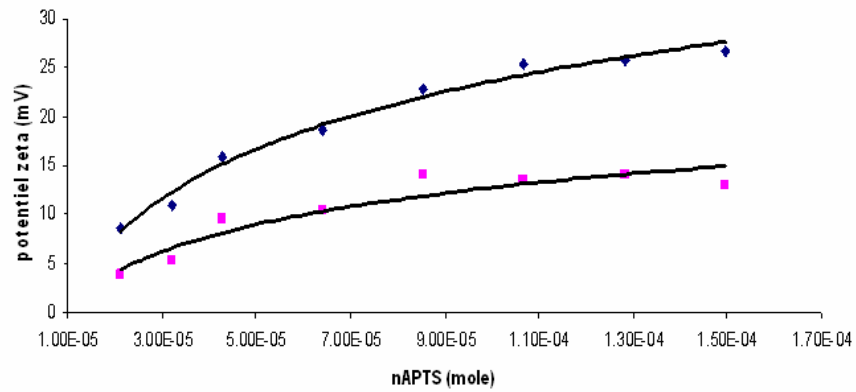
La figure 5 montre que l'aimantation de la solution de NPCC augmente avec le champ magnétique extérieur appliqué jusqu'à atteindre un plateau. Ces études d'aimantation ont également montré qu'il n'existe pas de mémoire ou rémanence magnétique au sein des cœurs d'oxyde de fer, ce qui est caractéristique des objets superparamagnétiques. Après normalisation par la fraction volumique des NPCC, l'aimantation à saturation a été évaluée à  $3 \times 10^5$  A/m. La taille des grains d'oxyde de fer est primordiale sur leur aimantation. Suivant leur taille, les grains seront mono (de 5 à 50 nm) ou multidomaines (>50 nm), c'est-à-dire présentant un ou plusieurs vecteurs moments magnétiques par grain. Les monodomaines sont préférés car la réponse à l'aimantation est plus rapide et plus forte, l'énergie à fournir pour orienter les grains étant moins élevée.

### III.3°) Caractérisation de l'état de surface des nanoparticules

Comme nous l'avons évoqué dans la partie synthèse, la surface des NPCC est recouverte de chaînes de PEG et de fonctions  $\text{NH}_2$  en quantités variables selon le rapport APTS/PEOS fixé lors de la synthèse.

En fonction du pH de l'électrolyte, les fonctions amines confèrent une charge de surface aux NPCC, cette charge de surface a été étudiée par deux techniques : la zétamétrie et l'électrophorèse capillaire. Pour obtenir des objets présentant des propriétés de surface différentes, plusieurs échantillons de nanoparticules ont été synthétisés en faisant varier le rapport APTS/PEOS (de 0,25 à 1,75), on obtient ainsi des objets qui présentent une charge de surface qui devrait varier. La figure 6 montre l'évolution de la charge de surface des NPCC mesurée à pH 7,4 pour des quantités croissantes d'APTS ce qui correspond à une augmentation du rapport APTS/PEOS (la quantité de PEOS étant constante pour chaque synthèse). Pour les deux techniques de mesure, la charge de surface est déterminée par mesure du potentiel zêta qui représente la valeur de la charge à l'interface de la couche compacte et diffuse des ions à la surface des NPCC.





**Figure 6. Potentiel zêta des NPCC en fonction de la quantité d'APTS introduite mesuré dans un tampon MOPS à 150mM et pH 7,4 en zétamétrie (carré rose) et en électrophorèse capillaire (bleu).**

Nous observons que les huit types de NPCC possèdent une charge positive à pH 7,4 et que cette charge augmente lorsque la quantité d'APTS utilisée lors de la synthèse augmente. Un début de plateau apparaît pour les plus hautes valeurs. Bien que les deux techniques montrent la même tendance, les valeurs de potentiel zêta sont différentes ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de mesures et de modèles mathématiques différents. Une étude concernant l'influence du pH sur la charge a montré que les NPCC restaient positives avec un potentiel zêta compris entre 24 et 8 mV pour un pH compris entre 3 et 9. De plus, le travail mené par Fanny d'Orlyé lors de sa thèse a permis de séparer les huit types de NPCC par électrophorèse capillaire de zone, plus le rapport APTS/PEOS augmente et plus la mobilité électrophorétique des NPCC augmente.

Le dosage des fonctions amines a été mené en parallèle car la mesure de la charge ne permet pas la quantification de ces amines de surface. Ce dosage a été effectué en utilisant la ninhydrine ou Kaiser test (Annexe 3). La ninhydrine assure l'hydrolyse des  $\text{NH}_2$  et conduit à la formation d'un complexe coloré quantifié par spectrométrie d'absorbance UV. Ainsi, à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie, le nombre de groupements  $\text{NH}_2$  par nanoparticule pour les huit rapports APTS/PEOS a pu être déterminé. Les résultats sont rapportés dans le tableau 1.

Ratio APTS/PEOS	0,25	0,35	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75
quantité d'APTS introduite (mol)	8,55E-05	1,20E-04	1,71E-04	2,56E-04	3,42E-04	4,27E-04	5,13E-04	5,98E-04
quantité d'APTS greffée (mol)	1,82E-05	1,65E-05	2,77E-05	3,73E-05	4,93E-05	7,25E-05	7,84E-05	6,56E-05
rendement greffage d'APTS (%)	21,3	13,8	16,2	14,5	14,4	17	15,3	11
nombre de NH <sub>2</sub> /nanoparticule	1384,1	1256,5	2106,9	2839,7	3757,0	5524,8	5972,7	4987,3
nombre de NH <sub>2</sub> /surface (nm <sup>2</sup> )	0,3	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1	1,2	1
RSD sur le dosage (%)	6,7	3,4	3,9	4,5	2,6	3,4	3,5	9,5

**Tableau 1. Résultats du dosage des groupements amines à la surface des nanoparticules.**

Comme attendu, la densité surfacique des NH<sub>2</sub> augmente avec le ratio APTS/PEOS jusqu'à atteindre un plateau qui pourrait traduire la saturation de la surface des NPCC. Le rendement de greffage moyen est de 15%. L'ensemble de ces résultats a mené à une publication [21] (Annexe 5).

La présence des PEG n'a pas pu être mise en évidence par des mesures directes. Une synthèse en absence de PEOS a été effectuée et la stabilité des NPCC obtenue n'était maintenue que pendant quelques heures, la présence des PEG a ainsi été confirmée par l'évaluation de la stabilité des NPCC. Cette observation confirme l'importance de la combinaison des PEG et des NH<sub>2</sub> pour la stabilité colloïdale de ces objets. Cette stabilité, point central de notre étude, est décrite plus en détails dans la partie suivante.

#### III.4°) Stabilité colloïdale et mouvement brownien

Les NPCC que nous avons synthétisées ont été fonctionnalisées par des chaînes de PEG et des groupements NH<sub>2</sub> dans l'optique de pouvoir greffer des biomolécules d'intérêt à leur surface mais également de les maintenir en suspension. Par définition une suspension colloïdale est composée d'un système multiphasique : la nanoparticule (l'élément dispersé) et un milieu continu (le dispersant). Ce système est stable lorsqu'aucune séparation de phase ne se produit. La taille critique à partir de laquelle la nanoparticule sédimente peut être déterminée par la formule suivante:

$$r_{max} = \left( \frac{3T k_b}{4\pi \Delta \rho g} \right)^{\frac{1}{4}}$$

où  $r_{max}$  est le rayon limite de la particule,  $k_b$  la constante de Boltzmann (J/K),  $T$  la température (K),  $\Delta \rho$  la différence de masse volumique entre les deux phases (Kg/m<sup>3</sup>) et  $g$  l'accélération de la pesanteur (m/s<sup>2</sup>).

L'agitation thermique se charge de maintenir ces objets en solution. Les interactions répulsives de nature stérique et électrostatique assurent la stabilité des objets en solution. La répulsion stérique étant assurée par la présence des chaînes de PEG et la répulsion électrostatique étant assurée par la charge globale positive des groupements amines ionisés. Les ions et contre-ions vont se répartir en deux couches autour de la nanoparticule, une première couche compacte de contre-ions et de molécules d'eau se concentrent à la surface de la coquille de silice, une seconde couche diffuse assure la répartition homogène des ions et contre-ions. Au-delà de cette couche, la solution est électriquement neutre. L'épaisseur de cette double couche (appelée longueur de Debye) dépend de la nature du milieu, de la force ionique et de la constante diélectrique. Si la force ionique augmente l'épaisseur de cette couche diminue, il y a contraction des charges à la surface de la nanoparticule. Ceci a pour effet de diminuer la portée des charges électrostatiques ce qui diminue la répulsion des objets et favorise leur agrégation. De même, si la constante diélectrique du milieu diminue, les répulsions diminuent également.

Le modèle de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) est généralement utilisé pour décrire la métastabilité des systèmes colloïdaux en prenant en compte les interactions de Van der Waals (VDW) de nature attractives et les forces électrostatiques [22] de nature répulsives lorsque les objets sont de même charge. L'énergie globale du système à une distance donnée de l'objet est la somme des énergies de VDW et électrostatiques. A longue distance, les grains ne subissent pas d'interactions particulières, ils sont soumis à la simple agitation brownienne, le système est stable. En se rapprochant, les particules sont soumises aux forces électrostatiques et de VDW, il s'exerce d'abord une interaction attractive réversible. A courte distance, les particules sont confrontées à une barrière énergétique dont l'énergie d'activation ( $E_a$ ) dépend principalement de la portée des interactions électrostatiques et de l'énergie d'activation thermique ( $kT$ ). Deux cas sont ainsi envisageables :

- $E_a < kT$ : les grains flocculent de manière irréversible. La simple agitation thermique permet le passage de la barrière énergétique amenant le système à un minimum énergétique primaire stable.
- $E_a > kT$ : le système est métastable. La cinétique d'agrégation est lente.

La force ionique est le facteur physico-chimique influant le plus sur la portée des interactions électrostatiques et donc sur l'énergie d'activation  $E_a$ . A faible force ionique, les particules sont principalement soumises aux forces électrostatiques, le système est considéré comme stable. Au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique, l'énergie d'activation  $E_a$  diminue et le système floccule de plus en plus rapidement.

Le mouvement brownien est proportionnel à la masse de l'objet. Plus cette dernière est petite et plus la vitesse liée au mouvement brownien sera importante comme le montre l'équation suivante :

$$v = \sqrt{3k_b T / m}$$

Avec  $v$  la vitesse de la nanoparticule (m/s),  $k_b$  la constante de Boltzmann (J/K),  $T$  la température (K) et  $m$  la masse de l'objet (Kg).

Des études ont montré que ce mouvement brownien favorise le transport de masse en solution [23]. Ce n'est pas directement les chocs entre les nanoparticules et les molécules qui vont améliorer ce transport de masse mais c'est la variation des champs de vitesse d'écoulement des fluides, dû à ce mouvement brownien, qui va entraîner des courants convectifs locaux améliorant ainsi le transport de masse.

Les NPCC ont ainsi été utilisées dans notre projet en tant que nanoplateforme possédant des propriétés colloïdales et diffusives qui devraient permettre une capture efficace de la molécule cible en solution.

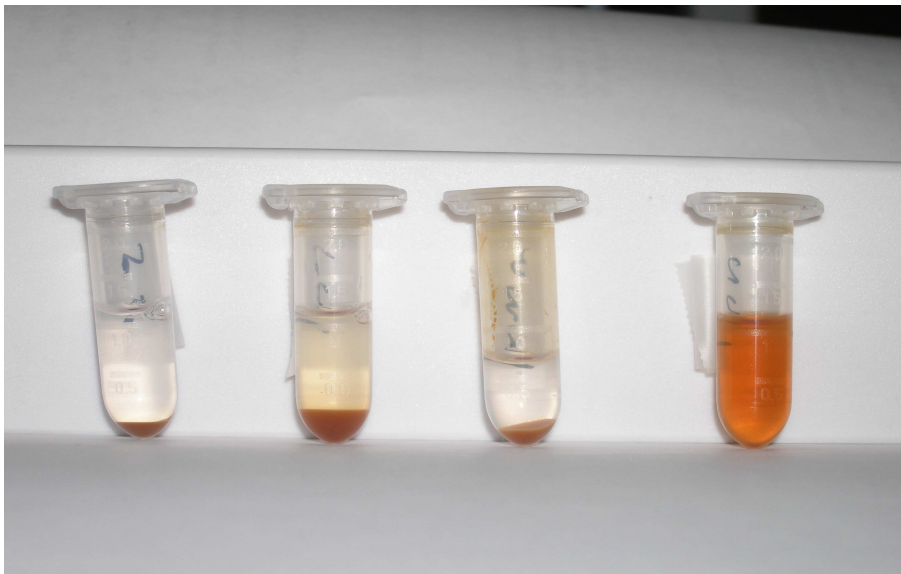
#### **IV°) Greffage de l'antigène à la surface des nanoparticules**

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce chapitre, le diagnostic de l'allergie au lait repose sur la quantification d'Ac de type IgE anti- $\alpha$ -lac dans le sérum des patients. Afin de pouvoir capturer ces IgE, les NPCC ont été greffées avec un allergène du lait : l' $\alpha$ -lac.

##### **IV.1°) Choix de l'antigène et méthode de greffage**

Notre étude se déroule dans un contexte de diagnostic de l'allergie au lait. Les principaux allergènes du lait sont des protéines : caséine,  $\beta$ -lactoglobuline, albumine de sérum bovin (BSA), lactoferrine et  $\alpha$ -Lac. Afin de choisir l'allergène potentiellement greffable à la surface des NPCC tout en conservant leur caractère colloïdal, les nanoparticules ont été mises en présence des quatre allergènes majeurs dans quatre tubes différents, chacun contenant la même concentration en nanoparticules et en protéines. Une simple observation visuelle a pu mettre en évidence une agrégation des NPCC, la figure 7 nous montre que ces dernières (phase marron) sédimentent en moins de 5 minutes en présence de  $\beta$ -lactoglobuline, de caséine et de BSA. Ce phénomène peut

être expliqué par les forces de déplétion. En effet, chaque particule est entourée d'une couche au sein de laquelle les molécules comme les polymères ne peuvent pas pénétrer. Cette couche d'exclusion est appelée la zone de déplétion et son épaisseur est de l'ordre de grandeur des polymères. Quand deux colloïdes s'approchent, leurs zones de déplétion peuvent se recouvrir et le volume disponible pour les polymères augmente. Ainsi, l'entropie du système augmente et l'énergie libre diminue ce qui crée une interaction attractive entre les colloïdes due à la pression osmotique engendrée par les polymères [24].

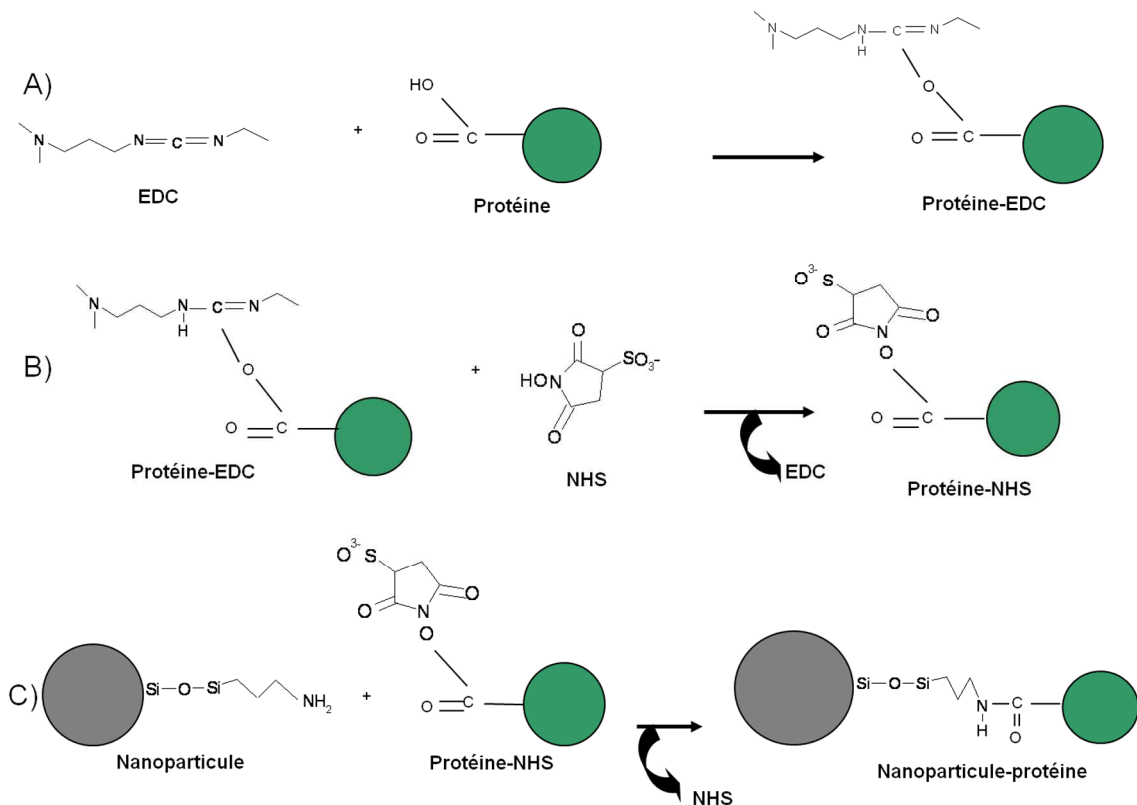


**Figure 7. Photographie de tubes contenant des NPCC ( $3,15 \times 10^{14}$  nanoparticules/mL) mélangées à des protéines de lait à  $9,5 \mu\text{mol/L}$ . De gauche à droite :  $\beta$ -LactoglobulineB (pI : 5,2), caseine (pI : 4,6), BSA (pI : 5,5) et  $\alpha$ -lac (pI : 4,5).**

En revanche en présence d' $\alpha$ -lac les nanoparticules restent stables en solution (tube de droite en figure 7) et ce pendant au moins 5 jours, le caractère colloïdal est donc maintenu. Ces résultats montrent que la nature de la protéine à greffer est donc un paramètre à prendre en considération, l'effet de déplétion peut être lié à la taille, la charge et la conformation des molécules. Dans notre cas l' $\alpha$ -lac est la plus petite des quatre protéines et possède le point isoélectrique (pI) le plus faible ce qui pourrait expliquer la différence avec les trois autres protéines sur cet effet de déplétion. Le choix de l'Ag à greffer sur les nanoparticules s'est donc porté sur l' $\alpha$ -lac. Cette protéine est de nature globulaire, présente une masse de 14 000 Da et un pI de 4,5. Notons que des études préliminaires ont montré qu'en abaissant le pH, le phénomène de déplétion disparaissait dans le cas

de la  $\beta$ -lactoglobuline. En effet, la baisse du pH permet d'obtenir des NPCC et des protéines chargées positivement ce qui favoriserait leurs répulsions et limiterait leurs interactions. Le greffage d'autres allergènes serait alors envisageable.

L' $\alpha$ -lac a été greffée de manière covalente à la surface des NPCC, en effet les greffages par simple physisorption sont simples à mettre en œuvre mais peuvent parfois entraîner la dénaturation des protéines et la formation d'agrégats sur les surfaces. L'approche covalente permet d'avoir un degré de contrôle sur la densité de greffage ou encore sur l'orientation des molécules. Il existe différents protocoles de greffage des protéines utilisant des réactifs très divers tels que le glutaraldéhyde [25], le bromure de cyanogène [26], l'hydrazine [27], le periodate [28], les sels de diazonium [29]...L'immobilisation de protéines (anticorps, enzyme...) sur des supports solides a été très développée au sein de notre équipe notamment pour le développement d'immunoadsorbants [30-34] dédié à l'extraction en phase solide de molécules d'intérêt. Ces techniques permettent l'extraction et l'enrichissement des analytes avant leur détection au sein de systèmes chromatographiques. Notre choix s'est porté sur le couple 3-diméthylaminopropylethylcarbodiimide (EDC) et le Sulfo-N-hydroxysuccinimide (NHS) très largement décrit car les conditions de greffage sont simples, rapides tout en présentant un rendement efficace. La fonction COOH des protéines n'est pas très réactive et nécessite son activation par le couple EDC/NHS pour former dans un premier temps un ester activé de l'EDC. Cet ester, peu stable en solution aqueuse, est remplacé par un ester du NHS plus stable et plus réactif qui sera en mesure de réagir avec les fonctions amines des nanoparticules pour former une liaison amide avec les acides carboxyliques des protéines comme le montre la figure 8. Pour chaque couple protéine / support, les conditions de greffage doivent être optimisées.



**Figure 8. Greffage covalent de protéines utilisant l'EDC et le NHS comme agents de couplage. (A) Formation de l'ester de l'EDC sur la protéine. (B) Modification de l'ester EDC en un ester NHS. (C) Formation de la liaison amide entre la nanoparticule et la protéine.**

IV.2°) Optimisation du greffage covalent de protéines à la surface de nanoparticules par approche chimométrique

#### IV.2.1°) Préambule

Le greffage de l'Ag est critique dans le développement d'un immunoessai et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les performances d'un immunoessai vont dépendre de la quantité d'Ag immobilisés ainsi que de son accessibilité, paramètres qui sont corrélés à la densité de greffage. De plus, dans le cas d'un immunoessai en phase colloïdale, la stabilité du support est critique notamment en termes de reproductibilité de l'analyse, le pontage peptidique pouvant créer des agrégats instables de nanoparticules. Enfin, il faut que la molécule greffée conserve son activité,

dans le cas des immunoessais cette activité correspond à la capacité de reconnaissance entre l'Ac et l'Ag dont les structures peuvent être dénaturées après greffage et ainsi modifier leur interaction.

Dans ce contexte, l'influence de différents facteurs comme les rapports molaires NHS/EDC, EDC/ $\alpha$ -lac et la concentration en  $\alpha$ -lac a été évaluée sur la densité d'Ag greffés par NPCC, sur la taille des nanoparticules et sur le maintien de l'interaction Ag/Ac.

Dans la majorité des études, l'optimisation du greffage de biomolécules à la surface des supports s'effectue de manière séquentielle, l'un des paramètres étudiés varie et tous les autres sont fixés. Cette approche ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les facteurs et nécessite beaucoup de points expérimentaux. L'approche des plans d'expériences permet de mettre en évidence l'influence de chacun des facteurs étudiés ainsi que leurs interactions le tout avec un minimum d'expériences. Notre étude s'est faite en deux temps, un premier plan d'expériences a permis d'établir le domaine d'étude dans lequel pouvait se trouver les valeurs optimales des facteurs étudiés. Le second plan d'expériences, établi sur un domaine d'étude plus restreint, a permis de déterminer les valeurs optimales de chacun des facteurs étudiés.

Les modèles statistiques permettent de prédire les valeurs des facteurs pour lesquelles le nombre de protéines greffées est maximal. Ces prédictions ont été validées et confirmées expérimentalement.

Une fois les paramètres de greffage optimisés, la stabilité colloïdale des NPCC greffées avec l'Ag et sa reconnaissance spécifique vis à vis de son Ac ont été étudiées en fonction du pH et de la force ionique.



## IV.2.2°) Article 1 :

Talanta 81 (2010) 1703–1710



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core–shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay

Bruno Teste<sup>a</sup>, Jérôme Vial<sup>a</sup>, Stéphanie Descroix<sup>a,\*</sup>, Thomas Georgelin<sup>b</sup>, Jean-Michel Siaugue<sup>b</sup>, Jan Petr<sup>c</sup>, Anne Varenne<sup>c</sup>, Marie-Claire Hennion<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA) UMR 7195, CNRS-ESPCI-UPMC, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>b</sup> Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA) UMR 7195 CNRS-UPMC-ESPCI, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>c</sup> Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA) UMR 7195 CNRS-ENSCP-UMPC, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 October 2009

Received in revised form 10 March 2010

Accepted 18 March 2010

Available online 25 March 2010

## Keywords:

Covalent immobilization  
 $\alpha$ -Lactalbumin  
 Magnetic core–shell nanoparticles  
 Experimental design  
 EDC  
 NHS

## ABSTRACT

A chemometric approach was developed to optimize the grafting of a bovine milk allergen:  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -Lac) on colloidal functionalized magnetic core–shell nanoparticles (MCSNP). Such nanoparticles, functionalized with polyethyleneglycol and amino groups, exhibit a 30 nm physical diameter and behave as a quasi-homogeneous system. The  $\alpha$ -Lac immobilization was achieved through the covalent binding between MCSNP amino groups and  $\alpha$ -Lac carboxylic moieties using the well-known tandem carbodiimide (EDC) and hydroxysulfosuccinimide (NHS). In this study, a chemometric approach was employed to highlight the parameters influencing the number of grafted proteins on the MCSNP. Three factors were evaluated: the ratio in concentration between EDC and  $\alpha$ -Lac, between NHS and EDC and the concentration of  $\alpha$ -Lac. After a first full factorial design to delimit the region of the space where the optimum could be located, a central composite design was then carried out to predict the best grafting conditions. It was established and experimentally confirmed that the optimum parameters are [EDC]/[ $\alpha$ -Lac] = 25; [NHS]/[EDC] = 1.55 and  $\alpha$ -Lac = 24.85 nmol mL<sup>-1</sup>. In these optimal conditions, MCSNP surface was successfully saturated with  $\alpha$ -Lac (34  $\alpha$ -Lac/MCSNP) with a high reproducibility (RSD = 2%). The colloidal stability of MCSNP grafted with  $\alpha$ -Lac as well as the immunological interactions using anti  $\alpha$ -Lac antibody were then investigated in different buffers. The results emphasized that a 50 mM MES buffer (pH 6) allows an efficient immune capture and a satisfying colloidal stability which provide an immunological interaction in homogeneous liquid phase.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In the field of bioanalytical systems, the role played by biomolecules immobilization can be considered as a crucial point since it conditions the maintaining of good catalytic activity [1] and protein stability [2]. Immunochemical techniques, consisting in capturing and quantifying antigens (Ag) or antibodies (Ab), are widely used because of their high specificity and sensitivity. Among the variety of immunoassays, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) offers the skills previously mentioned in an easy process. The first step of immunoassays consists in an efficient Ag or Ab immobilization according to the employed format. Two main ways exist to achieve biomolecules grafting, namely the covalent binding and the physical adsorption.

In the case of ELISA, biomolecules grafting is usually performed by physical adsorption. This simple process suffers from

major drawbacks like molecules attachment which occurs randomly, proteins denaturation, decrease of immunological capture efficiency and problems of molecules accessibility, notably in reason of overlapping phenomenon [3]. Covalent anchoring ensures a stronger and more reproducible attachment compared to randomized adsorption. Many cross-linkers such as glutaraldehyde [4], epoxy [5] or carbodiimide [6] are widely employed for protein or DNA grafting in a two steps procedure: surface activation and biomolecules immobilization. Some grafting procedure using biotinylation permitted molecules orientation increasing immunological capture efficiency [7].

Another important point is that ELISA techniques cannot pretend to reflect homogeneous liquid phase *in vivo* immune interactions as one of the partner remains immobilized on solid support. Moreover, since only one partner of the immunological interaction is really diffusing in solution, it results in longer analysis time. In order to overcome these problems, the use of latex beads [8] and magnetic beads [9–12] as biomolecule support inside microsystems allows a better accessibility as well as an increase of surface to volume ratio and a reduced diffusion distance. Nevertheless,

\* Corresponding author. Tel.: +33 1 40 79 46 44; fax: +33 1 40 79 46 54.  
 E-mail address: [stephanie.descroix@espci.fr](mailto:stephanie.descroix@espci.fr) (S. Descroix).

these microsystems analyses are still performed in heterogeneous phase since the beads are of micrometric size and cannot diffuse in solution.

Nanoparticles are getting an interesting tool for various biological technologies. They were mostly used in label technologies for rapid and ultra sensitive detection [13,14] but rarely as an immunological capture support. Li and coworkers [4] successfully constructed piezoelectric immunosensor based on magnetic nanoparticles attached to quartz crystal, but such immunoassay was still performed in heterogeneous phase.

We have previously designed magnetic core-shell nanoparticles (MCSNP) [15] functionalized both with polyethyleneglycol (PEG) which allows a reduction of biomolecules non-specific adsorption and amino groups which permit biomolecules covalent immobilization. These MCSNP were characterized by different techniques and notably by capillary electrophoresis in a previous work [16]. Noteworthy, these MCSNP present an interesting colloidal stability for months without forming cluster, and should then constitute good candidates for an immunological capture support in homogeneous phase. Another feature of the MCSNP is based on their magnetic properties that allow their trapping when a magnetic field is applied.

The challenge of our project is to develop an immunoassay that should provide analysis time reduction, high sensitivity and should mimic homogeneous liquid phase *in vivo* immune interactions. This last point remains crucial in Ag-Ab affinity evaluation as a characterization tool for diseases evolution. The feasibility of this innovative immunological support will be demonstrated in the case of milk allergy diagnosis using  $\alpha$ -Lac.

The first step of this work consists in optimized Ag covalent immobilization on MCSNP while keeping their colloidal stability in view of performing immunoassay in homogeneous phase. Examples of proteins grafting on micrometric beads have already been published but, up to our knowledge, no study concerning optimization of protein immobilization on sub-100 nm MCSNP dedicated for immunoassay has ever been reported.

This article describes the grafting optimization of  $\alpha$ -Lac at the surface of these sub-100 nm MCSNP. It is based on a one step amide bond formation between MCSNP amino groups and  $\alpha$ -Lac carboxylic moieties using EDC and NHS [17] under neutral pH conditions. Classical way for optimization consists in varying only one factor at a time (univariate approach) [6]. This optimization approach would require a lot of runs with a lack of efficiency and could fail to carry out the true optimum because it neglects factors interactions, i.e. coupled effects of different factors. The design of experiment (multivariate approach) [18] enables studying effects of all factors and interactions by applying simultaneous controlled variations. In the present study, grafting optimization was performed thanks to this chemometric approach. A two steps strategy was implemented to first define the region of the experimental domain where the optimum could be located using a two levels factorial design, and then to predict the  $\alpha$ -Lac optimum grafting conditions using a central composite design. Finally, the influence of storage conditions (buffer, pH) in sight of immobilized  $\alpha$ -Lac biorecognition and  $\alpha$ -Lac grafted MCSNP stability was evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC); N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS); 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid sodium salt (MOPS); 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt (MES); 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

sodium salt (HEPES); tetraethoxyorthosilicate (TEOS); 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTS);  $\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk ( $\alpha$ -Lac); O-Phenylenediamine (OPD); Tween® 20; formic acid and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Citric acid was purchased from Merck (Nogent sur Marne, France). 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]-trimethoxysilane (PEOS), containing 3-6 ethylene oxide groups, was purchased from Gelest (Morrisville, PA, USA). Polyclonal IgG anti  $\alpha$ -Lactalbumin antibody horseradish peroxidase (HRP) conjugated from goats (specific Ab) was purchased from GeneTex® Inc (Irvine, CA, USA). Polyclonal anti IgG HRP conjugated from goats (non-specific Ab) was purchased from Bioss Technology (Paris, France). 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2N HCl and 2N NaOH solutions were obtained from VWR (Strasbourg, France). Microplates 96 wells were purchased from Greiner BioOne (Courtboeuf, France). 2 mL Eppendorf tube were obtained from Eppendorf AG (Hamburg, Germany). Micro BCA protein assay was purchased from Pierce (Rockford, IL, USA).

### 2.2. Apparatus and softwares

All rinsing steps were performed using sigma 2K15 centrifuges from Mediatech Scientific (Clamart, France) or MS column with MACS separator magnet from Miltenyi (Paris, France). MCSNP diameter measurements were performed with Nano ZS Zetasizer (Malvern Instrument, Worcestershire, UK). Ultrasonic wave cleaner 45 Hz was obtained from VWR (Strasbourg, France). Solutions absorbance was read using SpectraMaxM2 microplate reader from Molecular Devices (St Grégoire, France). Grafting solutions were shaken using rotary disk agitator SB3 from VWR (Strasbourg, France).

The statistical data analyses were performed using JMP 5.1 (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA) and Excel 2003 (Microsoft Corporation, Courtboeuf, France).

### 2.3. Magnetic core-shell nanoparticles synthesis

Briefly, maghemite nanoparticles (7 nm in mean physical diameter) have been prepared by co-precipitation of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions under alkaline conditions as described by Massart [19]. Nanoparticles were then coated by citrate anions and dispersed in water [20]. These maghemite nanoparticles were further encapsulated in silica shells. A first silica shell was prepared in ethanolic medium in the presence of ammonia as a catalyst by condensation of TEOS [21]. The silica shell functionalization was carried out through a second step by simultaneous condensation of a silica amine derivated compound: APTS and a silica polyethyleneglycol derivated compound: PEOS. The concurrent addition of a small amount of TEOS resulted in the formation of a crosslinked silica shell [15]. The surface particle charge density can be tuned by varying the APTS to PEOS molar ratios, the amount of PEOS staying constant while the quantity of APTS increasing. The ratio used for our study was a 1:1 APTS/PEOS ratio. The reaction of silica condensation is carried out over a night and particles suspension was destabilized by diethyl ether. A red precipitate was formed and separated by magnetic settling. The precipitate was twice washed with a mixture of diethyl ether and ethanol (15:1) and then redispersed in 10 mM MOPS buffer (pH 7.5). This solution of amino-PEG functionalized MCSNP (approximately  $3.1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) was stable for months.

### 2.4. Preparation of grafting solution

350  $\mu$ L of MCSNP solution ( $3.1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) were mixed with 200  $\mu$ L of EDC (various concentrations), 200  $\mu$ L of NHS (various concentrations) and 400  $\mu$ L of  $\alpha$ -Lac solution (various concentrations) in a 2 mL Eppendorf tube. Each reagent solution was

freshly prepared in 10 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5). The concentrations of EDC, NHS and  $\alpha$ -Lac solutions are given in Section 3. All tubes were shaken by rotary movement (15 rpm) at 20 °C for 15 h.

### 2.5. Magnetic core-shell nanoparticles washing

#### 2.5.1. Washing steps using magnetical properties

First, MS column was washed 3 times with 500  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5). Then, the column was inserted inside MACS separator magnet. 400  $\mu$ L of the MCSNP solution ( $1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) just after Ag grafting or after interaction with Ab, were injected into MS column using micropipette. The trapped MCSNP were washed 3 times with 400  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5). The column was then removed from the magnet and the MCSNP were eluted with 400  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5).

#### 2.5.2. Washing steps using centrifugation

400  $\mu$ L from MCSNP solution ( $1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) just after Ag grafting or after interaction with Ab, were centrifuged at 14,000  $\times$  g during 10 min using a 2 mL Eppendorf tube. The supernatant was discarded and MCSNP were resolubilized in 400  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5) using an ultrasonic wave apparatus for 5 min to facilitate MCSNP solubilization. This step was repeated 3 times. MCSNP were finally solubilized in 400  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.5).

### 2.6. Quantitation of grafted $\alpha$ -Lac on magnetic core-shell nanoparticles

Quantitation of grafted  $\alpha$ -Lac on MCSNP (MCSNP $\alpha$ -Lac) was performed thanks to BCA protein assay test kit (according manufacturer recommendation). 150  $\mu$ L from the rinsed MCSNP $\alpha$ -Lac solution ( $1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) were mixed with 150  $\mu$ L of BCA test work reagent inside a microplate well at 37 °C. After 2 h incubation, MCSNP $\alpha$ -Lac were discarded using centrifugation or MS column in order to avoid any scattering effect and the absorbance of 300  $\mu$ L supernatant solution was read at 570 nm.

### 2.7. Immobilized $\alpha$ -Lac/antibody interaction and detection

400  $\mu$ L from the rinsed MCSNP $\alpha$ -Lac solution ( $1 \times 10^{14}$  MCSNP $\alpha$ -Lac mL<sup>-1</sup>) were mixed with 50  $\mu$ L 90 ng mL<sup>-1</sup> specific or non-specific HRP labelled Ab (10 ng mL<sup>-1</sup> final concentration) for 2 h at room temperature, then rinsed 3 times with a 50 mM PBS-Tween (0.1%, v/v) and resolubilized in 400  $\mu$ L 50 mM MOPS/NaOH (pH 7.5). 100  $\mu$ L from this solution were mixed with 100  $\mu$ L 100 mM citrate buffer solution containing OPD (1 mg mL<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.06%, w/v) for Ab detection. After 30 min, the Ab conjugated HRP catalytic reaction was stopped with 50  $\mu$ L 2 M HCl. MCSNP were discarded using centrifugation or MS column in order to avoid any scattering effect and the absorbance of 150  $\mu$ L supernatant solution was read at 490 nm.

## 3. Designs of experiments

### 3.1. Choice of the responses

To evaluate the performance of the immobilization procedure, we chose as relevant response the amount of grafted  $\alpha$ -Lac on each MCSNP. Although it is not directly involved as a factor of experimental design, MCSNP hydrodynamic diameter after grafting was also measured using Dynamic Light Scattering method. Indeed, an increase of MCSNP hydrodynamic diameter would indicate the formation of clusters due to covalent binding between  $\alpha$ -Lac and

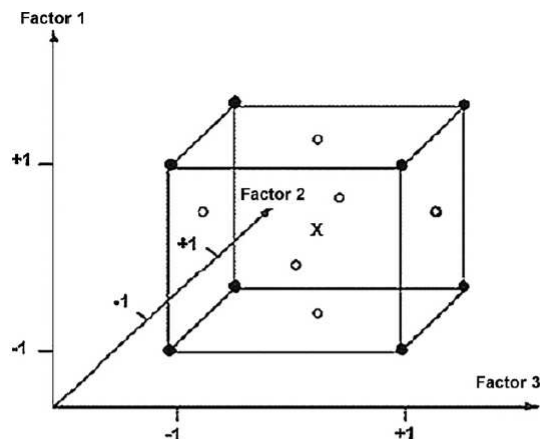


Fig. 1. 3D representation of a central composite design composed of 8 points from factorial design (●), one central point (X) (4 repetitions) and 6 axial points (○).

several MCSNP. As the hydrodynamic diameter of bared MCSNP was 65 nm (results not shown), we considered that hydrodynamic diameter higher than 130 nm would indicate cluster formation. The results obtained have shown that no cluster formation occurred as the hydrodynamic diameter of grafted MCSNP with  $\alpha$ -Lac was  $79 \pm 6$  nm. In the following discussion, the amount of immobilized  $\alpha$ -Lac was the only response taken into account.

### 3.2. Choice of the factors

Preliminary experiments (data not shown) concerning immobilization protocol using EDC/NHS couple led us to select 3 factors:

1. EDC/ $\alpha$ -Lac concentration ratio.
2. NHS/EDC concentration ratio.
3.  $\alpha$ -Lac molar concentration.

### 3.3. Choice of the experimental designs

The optimization strategy was sequential and proceeded in two steps. First we elaborated a two-level full factorial design (2<sup>3</sup>) for 3 factors. It allowed calculating the effect of each factor, to get a first outline of the response variations according to factors levels and to determine the experimental domain where the optimum could be located. A central composite design (CCD) [22] consisting of a second 2<sup>3</sup> factorial design, one central (4 repetitions) and 6 axial points, was then built. This CCD permits quadratic modelling useful for determining optimal grafting conditions. Fig. 1 shows a representation of the CCD in the experimental space. The 6 axial points are located in the centre of each cube faces.

### 3.4. Factors levels

[EDC]/[ $\alpha$ -Lac], [NHS]/[EDC], and [ $\alpha$ -Lac] were respectively denoted X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> and X<sub>3</sub> where X = (factor value – factor values mean)/(range/2), the high level being +1, the low level being –1 and the medium level being 0. Factors levels, in initial and coded values of the factorial design are shown in Table 1, they were chosen to cover the widest experimental but non-denaturing conditions. Indeed, we observed that beyond high values of factors ([EDC]/[ $\alpha$ -Lac] > 100 and [ $\alpha$ -Lac] > 31.05 nmol mL<sup>-1</sup>), proteins precipitation and MCSNP aggregation were favored. Thus, the domain of study was built far enough from these limit values in order to avoid these phenomenon. MCSNP concentration was constant

**Table 1**  
Domain of study for the 2<sup>3</sup> factorial design and the central composite design.

1st factorial design				Central composite design					
Factors	High level (+1)	Low level (-1)	Medium level (0)	Factors	High level (+1)	Low level (-1)	Medium level (0)		
X1	[EDC]/[α-Lac]	25	2	13.5	X1	[EDC]/[α-Lac]	25	13.5	19.25
X2	[NHS]/[EDC]	2	0	1	X2	[NHS]/[EDC]	2	1	1.5
X3	α-Lac (μg) (nmol mL <sup>-1</sup> )	400	100	250	X3	α-Lac (μg) (nmol mL <sup>-1</sup> )	400	250	325
		24.85	7.14	17.86			24.85	17.86	23.21

(3.1 × 10<sup>14</sup> MCSNP mL<sup>-1</sup>). The quantity of α-Lac was chosen to be in excess compared to MCSNP, approximately from 40- to 175-fold higher.

The domain of the CCD, defined from the results of the first 2<sup>3</sup> design was a narrower area of the previous domain and is given in Table 1.

3.5. Matrix of experiments

The 1st factorial design was composed of 12 experiments: 8 for the factorial design and 4 repetitions of the central point.

The central composite design was composed of 18 experiments: 8 for the second factorial design, 6 axial points and 4 repetitions for the central point (Table 2). All the experiments were randomized to avoid being affected by uncontrolled factors variations.

3.6. Model construction and coefficients calculation for the 1st factorial design

The following model has been used for responses modelling:

$$\hat{Y}_{p1} = \text{intercept} + E1 \cdot X1 + E2 \cdot X2 + E3 \cdot X3 + E12 \cdot X1X2 + E13 \cdot X1X3 + E23 \cdot X2X3 + E123 \cdot X1X2X3$$

where  $\hat{Y}_{p1}$  is the predicted response from linear model, intercept was the constant term,  $Ei$  the coefficient (effect) of the factor  $Xi$ ,  $Eij$  the coefficient of the interaction  $XiXj$  between factors  $i$  and  $j$ , and  $Eijk$  the coefficient of the interaction  $XiXjXk$  between the three factors.

Coefficients calculations were made thanks to multiple linear regression [23] of the 8 experiments from 1st factorial design using excel software.

**Table 2**  
Matrix of experiments for the 1st factorial design and for the central composite design.

Experiments	1st factorial design			Experiments	Central composite design		
	X1	X2	X3		X1	X2	X3
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	-1	2	1	1	-1
3	1	-1	1	3	1	-1	1
4	1	-1	-1	4	1	-1	-1
5	-1	1	1	5	-1	1	1
6	-1	1	-1	6	-1	1	-1
7	-1	-1	1	7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	8	-1	-1	-1
9	0	0	0	9	0	0	0
10	0	0	0	10	0	0	0
11	0	0	0	11	0	0	0
12	0	0	0	12	0	0	0
				13	0	0	-1
				14	0	-1	0
				15	0	1	0
				16	1	0	0
				17	0	0	1
				18	-1	0	0

3.7. Significant factors of the 1st factorial design

Factors significance was evaluated thanks to a Student's test ( $t$ ) [24] which consists in comparing the coefficient previously definite to its relative standard deviation (RSD) value. First, we estimated the response RSD, denoted  $\hat{\sigma}$ , using central point repetitions; we supposed that the RSD was constant on the entire experimental domain. The observed  $t$  value ( $t_{obs1}$ ) for each factors and interactions from 1st factorial design was calculated with the following equation:

$$t_{obs1} = \frac{\text{coefficient}}{\hat{\sigma}/\sqrt{N}}$$

where  $N$  is the number of experiments ( $=2^3$ ).

The  $t_{obs1}$  was compared to a tabulated reference ( $t_{ref}$ ) [24] depending on the first kind risk ( $\alpha$ ) and the number of degrees of freedom (dof) [25].

The decision rules were as follows: if  $t_{obs1} \in [-t_{ref}(\alpha, \text{dof}); t_{ref}(\alpha, \text{dof})]$  then the coefficient was not significant, if not the coefficient was significant.

3.8. Model validity for the 1st factorial design

Validation of the linear model consisted in comparing predicted and experimental values of the response at the central point thanks to a  $t$ -test ( $t_{obs2}$ ). The null hypothesis ( $H_0$ ) was as follows: the central point predicted value was equal to the central point experimental value. The observed value for  $t_{obs2}$  was:

$$t_{obs2} = \frac{|Y_e - Y_p|}{\hat{\sigma}\sqrt{(1/n_e) + (1/N)}}$$

where  $Y_e$  is the experimental response observed at the central point,  $Y_p$  the predicted response at the central point,  $n_e (=4)$  the number of repetitions at the central point and  $N$  the number of experiments ( $=2^3$ ).

The decision rules were as follows: if  $t_{obs2} \in [-t_{ref}(\alpha, \text{dof}); t_{ref}(\alpha, \text{dof})]$  then  $H_0$  is accepted, if not  $H_0$  is rejected.

3.9. Model construction and coefficients calculation for central composite design

The following quadratic model has been used for responses modelling:

$$\hat{Y}_{p2} = \text{intercept} + E1 \cdot X1 + E2 \cdot X2 + E3 \cdot X3 + E12 \cdot X1X2 + E13 \cdot X1X3 + E23 \cdot X2X3 + E123 \cdot X1X2X3 + E11 \cdot X1X1 + E22 \cdot X2X2 + E33 \cdot X3X3$$

where  $\hat{Y}_{p2}$  is the predicted response of the quadratic model, intercept the constant term,  $Ei$  the coefficient of the factor  $Xi$ ,  $Eij$  the coefficient of the interaction  $XiXj$  between factors  $i$  and  $j$ ,  $Eijk$  the coefficient of the interaction  $XiXjXk$  between the three factors and  $EiEi$  the coefficient of the square term  $XiXi$ .

**Table 3**  
Estimation of the coefficients and  $t_{obs1}$  calculation for each factor and interaction from 1st factorial design.

Experiments	Mean	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Y
1	1	1	1	1	1	1	1	1	33.5
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	8.1
3	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	22.4
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	13.8
5	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1.7
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0
7	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0
Coefficients	9.75	9.25	0.75	4.5	0.75	4	2	2	
$t_{obs1}$	25.9	24.6	2	12	2	10.6	5.3	5.3	
$t_{ref}$ (5%, 3 dof)	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	

Multiple linear regressions from the 18 experimental values of the CCD permitted to calculate model coefficients using JMP 5.1 software.

3.10. Significant terms for central composite design

Coefficients significance has been tested using Student's test which consisted in comparing the coefficient value to its RSD stemming from regression residual RSD. If the *P* value [24] (given by JMP 5.1 software) was lower than the first kind risk then the factor was considered as significant. These tests were carried out for information purposes only. All terms, even non-significant coefficients, were kept for the modelling used to determine the optimum.

3.11. Model validation for central composite design

The validation of the quadratic model was carried out by comparing the predicted response and the experimental response observed in predicted optimal conditions thanks to a *t*-test ( $t_{obs3}$ ).

$$t_{obs3} = \frac{|Y_{op} - Y_{oe}|}{\sqrt{\hat{\sigma}_p^2 + (\hat{\sigma}_e^2/n_e)}}$$

where  $Y_{oe}$  is the optimal experimental response,  $Y_{op}$  the optimal predicted response,  $\hat{\sigma}_p$  the quadratic model predicted residual RSD in the optimum conditions,  $\hat{\sigma}_e$  the  $Y_{oe}$  RSD,  $n_e$  (=4) the number of repetitions for  $Y_{oe}$ .

Rules decisions have already been reported for linear model adequacy.

4. Results

4.1. Results of the 1st factorial design

The results of coefficients estimations and  $t_{obs1}$  from the 1st factorial design are reported in Table 3.

$t_{obs1}$  and  $t_{ref}$  comparison underlined X1, X3, X1X3, X2X3 and X1X2X3 significant influence on the response in the 1st factorial design domain. For X1 = -1 (Table 3; entry 5, 6, 7, 8), the low value of the ratio [EDC]/[α-Lac] leads to no grafting of the protein on the MCSNP surface. The presence of polymer chains at the surface of the MCSNP is responsible for problems of anchoring sites accessibility, namely the amino groups. For those reasons, numerous carboxylic groups have to be activated in one protein in order to obtain an efficient grafting process at the surface of the MCSNP. In the same way, at low concentration of protein (X3 = -1, Table 3; entry 2, 4), poor covering of the surface is obtained. It means that high activation of proteins is not sufficient, notably because once activated, carboxylic groups can react with amino groups of the same or others proteins. So in order to have sufficient reactions with the few accessible MCSNP amino groups, the concentration of protein has to be high. The last factor seems to have less influence (Table 3; entry 3): it means that in our conditions, the activated ester due to the reaction between one carboxylic group and one EDC is reactive enough and that no supplementary activation with NHS is really necessary to have an efficient reaction with an amino group. We equally observed that high values of the response were obtained for high factors values (Table 3; entry 1).

The comparison of predicted Y (=9.8) and experimental Y (=21.9) at the central point revealed that the two values were statistically different with  $t_{obs2}$  (=39.5) >  $t_{ref}$  (=3.2). This means that the linear model was not satisfactory enough for modelling response vari-

**Table 4**  
Results of the central composite design.

Experiments	Mean	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	X1X1	X2X2	X3X3	Y
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32.5
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	21.8
3	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	32.1
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	17.7
5	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	28.1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	15.9
7	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	24.6
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	22.0
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26.1
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24.8
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.7
12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25.4
13	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	21.5
14	1	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	25.6
15	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	26.9
16	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	28.9
17	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	36.0
18	1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	25.0

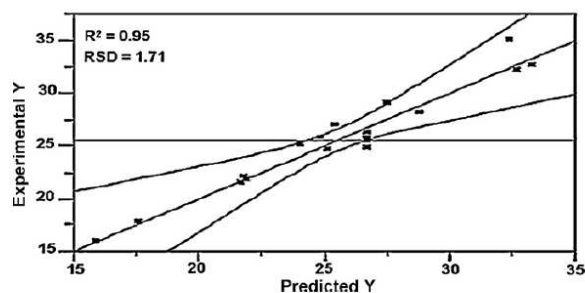


Fig. 2. Correlation graph between experimental Y and predicted Y from central composite design. The dots represent the experimental points, the regression line (centre line) is surrounded by the confidence curves underlining quadratic model residual RSD.

ations according to the studied factors. So, both to answer this matter and to have the ability to carry out a true optimization, a second experimental design was built in a narrower domain, defined thanks to first factorial design results. This new experimental domain should more likely contain the optimum. Moreover this second design must be compatible with optimization constraints, i.e. it must be a response surface design.

#### 4.2. Results for the central composite design

The experimental results for the CCD are exposed in Table 4.

Fig. 2 presents the experimental response versus the predicted one. Homogeneous scattering of residuals,  $R^2$  value of 0.95 and acceptable residual RSD of 1.71 indicate the global appropriateness of the quadratic model proposed. The confidence curves in Fig. 2 are not containing the horizontal line thus underlining the quadratic model significance.

Quadratic model factors and interactions coefficients estimations were gathered in Table 5.

A factor is considered as significant when  $P$  value  $< \alpha$ . When  $\alpha = 5\%$ ,  $X_1$  and  $X_3$  had a significant effect on the response. The positive value of  $X_1$  and  $X_3$  coefficient indicated that the response increased when the factors varied from their low to their high levels.  $X_2$  does not seem to have any influence on the response when  $X_1$  and  $X_3$  were put in their high and middle levels whereas it was significant when  $X_1$  and  $X_3$  were put in their low levels as shown in Table 5; these results underlined  $X_1X_2X_3$  significance. When  $\alpha = 10\%$ ,  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2X_3$  and  $X_1X_3$  had a significant influence on the response.

The significance of  $[\text{EDC}]/[\alpha\text{-Lac}]$  ( $X_1$ ) as well as  $[\alpha\text{-Lac}]$  ( $X_3$ ) was expected. As shown before, the covalent grafting of  $\alpha\text{-Lac}$  is possible because of the EDC ester formation on  $\alpha\text{-Lac}$  carboxylic moieties in order to create an amide bond with the accessible MCSNP amino groups thus the value of the ratio  $[\text{EDC}]/[\alpha\text{-Lac}]$  is a crucial point. Another part of the problem is to favor the reac-

**Table 5**  
Evaluation and significance of the quadratic model coefficients.

Factors	Coefficients	RSD	$t_{\text{obs}}$	P value
Constant	26.6643	0.6730	39.6200	<0.0001
$X_3$	5.3400	0.5410	9.8700	<0.0001
$X_1$	1.7400	0.5410	3.2200	0.0147
$X_1X_2X_3$	-1.6625	0.6048	-2.7500	0.0286
$X_1X_3$	1.2875	0.6048	2.1300	0.0708
$X_2X_2$	-1.5786	1.0393	-1.5200	0.1726
$X_1X_2$	0.8875	0.6048	1.4700	0.1857
$X_2X_3$	0.7375	0.6048	1.2200	0.2622
$X_1X_1$	-0.8786	1.0393	-0.8500	0.4258
$X_2$	0.3200	0.5410	0.5900	0.5728
$X_3X_3$	0.4214	1.0393	0.4100	0.6972

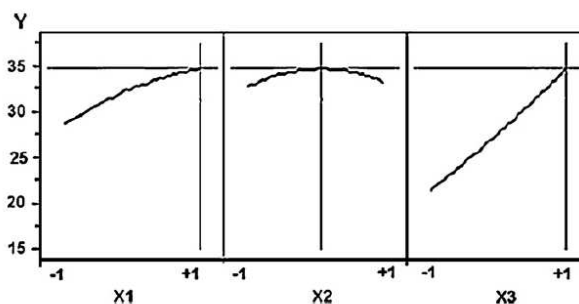


Fig. 3. Response variations according to the three main factors. Intersection indicates the factor coordinate for the highest response value.

tion between proteins and nanoparticles, leading to high values of the protein concentration, in order to efficiently compete with the numerous side reactions between activated carboxylic group and amino groups of proteins. The EDC ester is able to perform the amide reaction, so the replacement of EDC ester to NHS ester is not necessary in our context thus explaining the non-significance of  $[\text{NHS}]/[\text{EDC}]$  factor ( $X_2$ ).

Fig. 3 represents the variations of the response as a function of each factor. It indicated that the response increased monotonously with  $X_1$  in a parabolic profile and increased linearly with  $X_3$ . The variation as a function of  $X_2$  is parabolic: it increased till reaching a maximum, then decreased. The presence of NHS allows a slight increase of the number of grafted proteins till reach a maximum. When the quantity of NHS is too important, the increasing activation of carboxylic acid groups leads to more side reactions between proteins thus favoring proteins clusters. There was thus less free  $\alpha\text{-Lac}$  available for the MCSNP and consequently the amount of grafted  $\alpha\text{-Lac}$  on the MCSNP surface decreased. Although we only demonstrate the significance of  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2X_3$  and  $X_1X_3$ , all the coefficients were kept for the quadratic model elaboration in order to maximize prediction capability.

According to the previous results, the predictive model was given by the following equation:

$$\begin{aligned} \hat{Y} = & 26.66 + 1.74X_1 + 0.32X_2 + 5.34X_3 + 0.89X_1X_2 + 1.29X_1X_3 \\ & + 0.74X_2X_3 - 1.66X_1X_2X_3 - 0.88(X_1)^2 \\ & - 1.58(X_2)^2 + 0.42(X_3)^2 \end{aligned}$$

The predictive model allows predicting optimal conditions (Table 6).

According to the quadratic model, the maximum response value should be 34.5  $\alpha\text{-Lac}$  per MCSNP (data not shown). The experimental value for the response measured in optimum conditions was 34.1  $\alpha\text{-Lac}$  per MCSNP with a high reproducibility (RSD = 2%, 3 repetitions interday). The comparison of the two values showed that the predicted and experimental response values were non-statistically different ( $t_{\text{obs}3} = 0.4 < t_{\text{ref}} = 3.2$ ) which underlined the good adequacy between quadratic model and experiments.

Fig. 4 represents the contour plot of the isoreponses around the optimal as a function of  $X_1$  and  $X_2$ ,  $X_3$  being set at +1. The arrow indicates optimal coordinates for  $X_1$  and  $X_2$ . This isoreponse rep-

**Table 6**  
Optimal conditions of  $\alpha\text{-Lactalbumin}$  grafting according to the predictive model.

Factors	Optimal conditions	
	X	Real values
$[\text{EDC}]/[\alpha\text{-Lac}]$	+1	25
$[\text{NHS}]/[\text{EDC}]$	+0.08	1.55
$[\alpha\text{-Lac}]$	+1	24.85 nmol mL <sup>-1</sup>

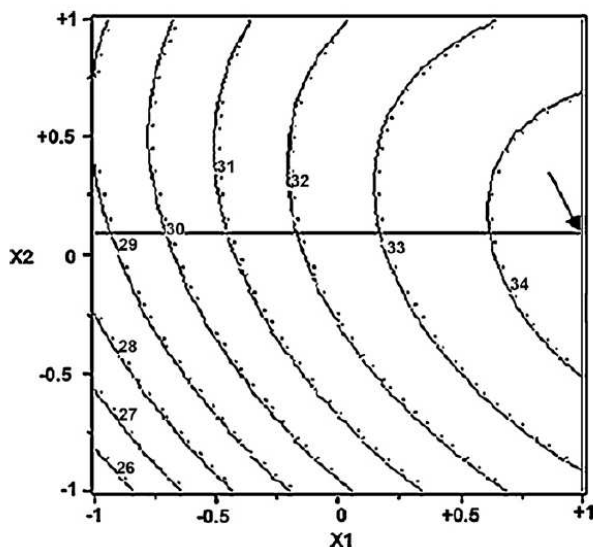


Fig. 4. Contour plot with isoresponses according to X1 and X2 in the near optimal domain with X3 = +1.

resentation with X1 and X2 was chosen as an example to show that the response variation when X1 and X2 vary is rather limited, which reflects grafting robustness [18] around optimal conditions. Slight increase of each factor ranging in the non-denaturing domain shows that the response does not increase any more, which could be explained by MCSNP surface saturation. Concerning grafting time dependence, the optimal grafting can be obtained after only 4 h of incubation (data not shown).

#### 4.3. $\alpha$ -Lac biorecognition

After the optimization of  $\alpha$ -Lac immobilization on MCSNP, the immunological recognition as well as colloidal stability were evaluated. First it was crucial to verify that  $\alpha$ -Lac conformation was still recognized using specific Ab. Then we needed to find the best conditions to ensure a good grafted  $\alpha$ -Lac/Ab interaction in solution which implies to keep MCSNP $\alpha$ -Lac colloidal behaviour. So we have tested different buffer composition and compared their influence on immune recognition and MCSNP $\alpha$ -Lac colloidal stability. Previous studies have shown that ionic strength ranging from 10 to 150 mM maintained MCSNP colloidal stability (data not shown). The chosen ionic strength was 50 mM to get a sufficient buffering capacity. Two parameters were then evaluated: buffer pH that was selected from 4 to 7.5 in order to surround  $\alpha$ -Lac pI value (4.2–4.5), and buffer nature. Thus, after performing  $\alpha$ -Lac optimum grafting, MCSNP $\alpha$ -Lac were solubilized in the buffers gathered in Table 7 in view of performing the immunoreactions with Ab. Fig. 5 shows the signal obtained using  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  (final concentration) of specific or non-specific labelled Ab.

**Table 7**  
Buffers used for immunoreactions and magnetic core-shell nanoparticles stability studies.

Buffers	Ionic strength (mM)	pH
Acetate	50	4
Formate	50	4
MES	50	6
PBS	50	7
HEPES	50	7.5
MOPS	50	7.5

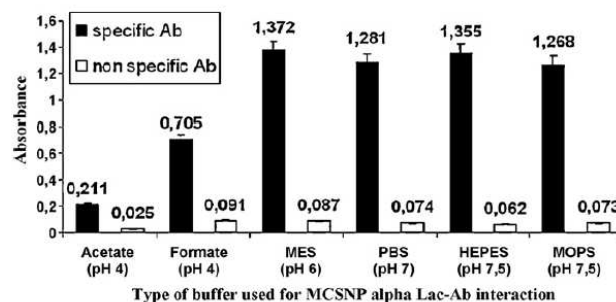


Fig. 5. Influence of pH and buffer nature on MCSNP $\alpha$ -Lac-Ab reaction. The experiments were performed by adding MCSNP $\alpha$ -Lac with specific or non-specific Ab for 2 h at 20 °C. After rinsing step, HRP conjugated Ab were detected by catalytic reaction using OPD substrate. Experiments were repeated 3 times (interday). See details in the text.

The specific Ab signal was 17-fold higher than non-specific Ab signal using buffers with pH from 6 to 7.5. These results demonstrated that grafted  $\alpha$ -Lac was not denatured after covalent immobilization and that non-specific interaction was negligible. When performing the same experiments with non-grafted MCSNP with  $\alpha$ -Lac, a signal of the same order of magnitude was observed for both specific and non-specific Ab. This indicates that Ab could interact with bare MCSNP surface probably due to electrostatic interaction with amino groups. These results demonstrated the necessity to saturate MCSNP with  $\alpha$ -Lac in order to overlap amino moieties and thus to avoid non-specific interaction.

As expected, buffers of pH ranging from 6 to 7.5 lead to approximately the same specific signal whereas in acidic buffer, the signal dramatically decreased especially for acetate buffer which is a chaotropic buffer disfavoring immune interaction. In parallel, these buffers do not have significant influence concerning non-specific signal, except for acetate which prevents more efficiently non-specific interaction.

The grafted MCSNP colloidal stability was then studied in the course of time using the same buffers. Colloidal stability was followed by visual observation of aggregate formation. Acidic buffers at pH 4 maintained MCSNP colloidal behaviour at least for many weeks whereas buffer above pH 6 lead to MCSNP aggregation after 2 days of storage at 4 °C. Indeed MCSNP $\alpha$ -Lac charge depends on APTS amino groups and  $\alpha$ -Lac charge. The pI of free  $\alpha$ -Lac remains around 4.5, it can thus be assumed that at pH 4, this protein and amino groups are globally positively charged which leads to electrostatic repulsions providing MCSNP colloidal stability. On the contrary, at pH 7.5, the amino moieties were still protonated whereas  $\alpha$ -Lac has some negative charges which could induce electrostatic interaction between MCSNP $\alpha$ -Lac favoring their aggregation. The results obtained with MES buffer at pH 6 are more surprising. Despite a pH value higher than free  $\alpha$ -Lac pI, a satisfying MCSNP $\alpha$ -Lac stability was obtained at least during 7 days. A possible explanation could be that  $\alpha$ -Lac structure and global charge were modified after immobilization, indeed  $\alpha$ -Lac carboxylic group are involved in the covalent binding, in this way  $\alpha$ -Lac becoming more basic, thus slightly modifying its pI. Finally, MES buffer appeared as a good compromise between Ab capture efficiency and MCSNP $\alpha$ -Lac stability.

In order to investigate further the influence of MCSNP $\alpha$ -Lac storage, immune response of grafted MCSNP after 7 days of storage was studied in MES and formate buffer which combine satisfying immunological capture and MCSNP $\alpha$ -Lac stability.

As illustrated in Fig. 6, the immobilized  $\alpha$ -Lac stored in MES was still recognized by specific Ab even 7 days after grafting with a little decrease (14%) of the signal. The non-specific signal given by non-specific Ab was maintained at low level but doubled. These results underlined that immobilized  $\alpha$ -Lac was slightly denatured after 1

1710

B. Teste et al. / Talanta 81 (2010) 1703–1710

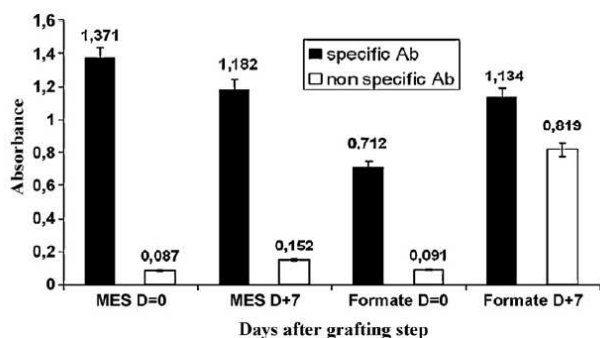


Fig. 6.  $\alpha$ -Lac recognition at one time after immobilization step. The experiments were performed by adding MCSNP $\alpha$ -Lac with specific or non-specific Ab for 2 h at 20 °C the day of  $\alpha$ -Lac immobilization (D=0) or 7 days later  $\alpha$ -Lac immobilization (D+7). HRP conjugated Ab were detected by catalytic reaction using OPD substrate. Experiments were repeated 3 times (interday). See details in the text.

week of storage in 50 mM MES buffer at pH 6. A BCA test which allows  $\alpha$ -Lac quantitation was performed on free  $\alpha$ -Lac solubilized in 50 mM MES buffer after a space of 7 days and revealed a loss of 20% of signal which could confirm a modification in  $\alpha$ -Lac structure. In formate we observed an increase of both signals obtained with specific and non-specific Ab. The increase of non-specific signal using non-specific Ab could be explained by the denaturation of grafted  $\alpha$ -Lac which give access to MCSNP surface and thus favor non-specific interactions with Ab. As previously mentioned, a BCA test has also been performed on free  $\alpha$ -Lac stored for 7 days in formate buffer. A decrease of 40% of the signal has been observed. It confirms the denaturation due to the buffer nature and underlined that this phenomenon is more important in formate than in MES. Concerning specific Ab reaction in formate, a part of the signal is certainly due to reaction between specific Ab and remaining native  $\alpha$ -Lac, the other part of the signal is due to non-specific interaction with MCSNP surface.

It can thus be concluded that to achieve the best specific and sensitive immunological capture as well as keeping MCSNP colloidal stability, immunological reaction should be performed in 50 mM MES buffer at pH 6.

## 5. Conclusion

The use of experimental design allowed the optimization of  $\alpha$ -Lac immobilization on MCSNP surface. This work was sequential. A 1st factorial design permitted to obtain a brief outline of factors influence on response variations and to determine an experimental domain that should contain the optimum. The subsequent central composite design was able to establish a predictive model in order to find out the optimal grafting coordinates which were experi-

mentally verified as well as robustness.  $\alpha$ -Lac biorecognition using anti- $\alpha$ -Lac antibody proved that the grafted protein was not denatured due to covalent immobilization and that  $\alpha$ -Lac recognition was specific. The chemometric approaches allowed MCSNP surface saturation with  $\alpha$ -Lac in non-denaturing conditions in order to efficiently capture specific anti- $\alpha$ -Lac antibody while avoiding non-specific antibody adsorption. Future works will consist in using MCSNP $\alpha$ -Lac in a microsystem scale in order to perform immunoassay dedicated to  $\alpha$ -Lac allergy diagnosis in homogeneous liquid phase.

## Acknowledgements

The authors thank the Agence national pour la recherche (ANR) for financial support. They also thank Bernard Malezieux for writing assistance.

## References

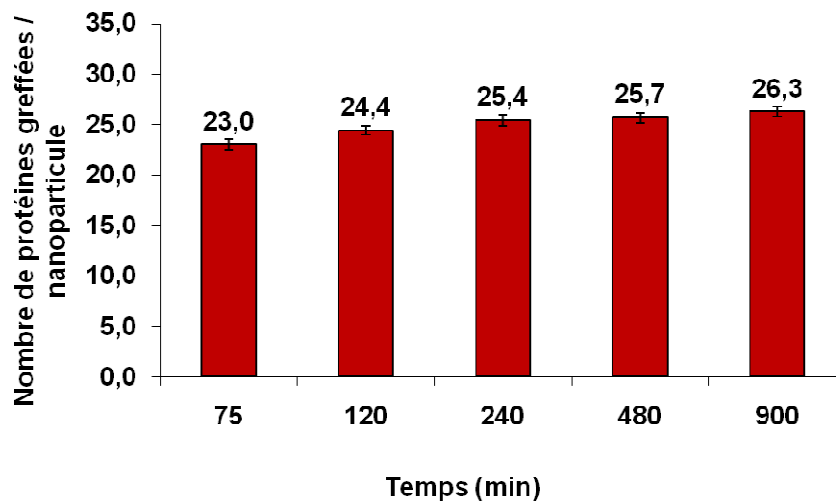
- [1] M. Slovakova, N. Minc, Z. Bilkova, C. Smadja, W. Faigle, C. Fütterer, M. Taverna, J.-L. Viovy, *Lab. Chip* 5 (2005) 935.
- [2] G. Bayramoğlu, S. Kiralp, M. Yilmaz, L. Toppare, M.Y. Arica, *Biochem. Eng. J.* 38 (2008) 180.
- [3] M.E. Soderquist, A.G. Walton, *J. Colloid Interface Sci.* 75 (1980) 386.
- [4] J. Li, X. He, Z. Wu, K. Wang, G. Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 191.
- [5] C. Peskoller, R. Niessner, M. Seidel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3794.
- [6] A. Weissenböck, M. Wirth, F. Gabor, *J. Control. Release* 99 (2004) 383.
- [7] I.H. Cho, E.H. Paek, H. Lee, J.Y. Kang, T.S. Kim, S.H. Paek, *Anal. Biochem.* 365 (2007) 14.
- [8] K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Lab. Chip* 4 (2004) 570.
- [9] K.S. Kim, J.K. Park, *Lab. Chip* 5 (2005) 657.
- [10] J.W. Choi, K.W. Oh, J.H. Thomas, W.R. Heineman, H.B. Halsall, J.H. Nevin, A.J. Helmicki, H.T. Henderson, C.H. Ahn, *Lab. Chip* 2 (2002) 27.
- [11] S.Y. Yang, K.Y. Lien, K.J. Huang, H.Y. Lei, G.B. Lee, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 855.
- [12] J. Do, C.H. Ahn, *Lab. Chip* 8 (2008) 542.
- [13] B.H. Hui, Z.J. Tsao, J.J. Wang, F.Y. Yu, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7029.
- [14] Y.J. Liu, D.J. Yao, H.Y. Chang, C.M. Liu, C. Chen, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 558.
- [15] V. Maurice, T. Georgelin, J.M. Siaugue, V. Cabuil, J. Magn. Magn. Mater. 321 (2009) 1408.
- [16] F. d'Orlyé, A. Varenne, T. Georgelin, J.M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil, *Electrophoresis* 30 (2009) 2572.
- [17] J.V. Staros, R.W. Wright, D.M. Swingle, *Anal. Biochem.* 156 (1986) 220.
- [18] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, pp. 643–658.
- [19] R. Massart, J.C. Bacri, R. Perzynski, D. Salin, *J. Magn. Magn. Mater.* 62 (1986) 36.
- [20] N. Fauconnier, A. Bee, J. Roger, J.N. Pons, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 100 (1996) 212.
- [21] Y. Lu, Y. Yin, B.T. Mayers, Y. Xia, *Nano Lett.* 2 (2002) 183.
- [22] J. Vial, A. Jardy, *Analisis* 26 (1998) 15.
- [23] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, pp. 263–303.
- [24] J.J. Daudin, S. Robin, C. Vuillet, *Statistique inférentielle*, Presses Universitaires de Rennes, Société Française de Statistique, 2001, pp. 85–98.
- [25] J. Sall, L. Creighton, A. Lehman, *JMP Start Statistics*, third ed., Thomson Books/Cole, Belmont, CA, USA, 2005, p. 397.



#### IV.2.3°) Autres facteurs influençant le greffage de l'antigène

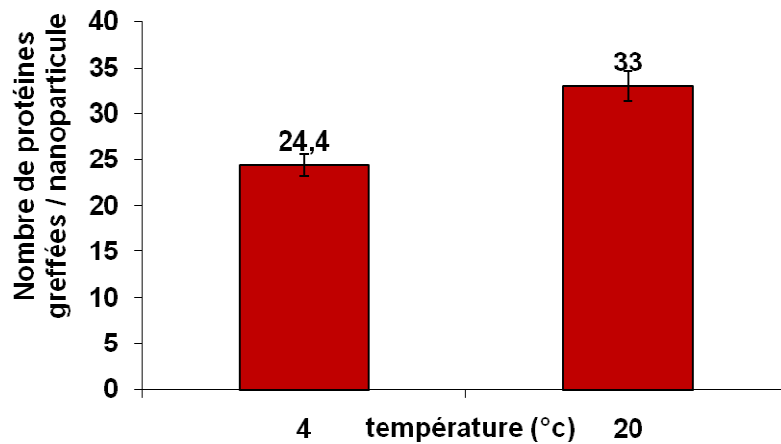
Après avoir mis en œuvre une approche de type plan d'expériences pour étudier l'effet des facteurs les plus influents sur le greffage, l'influence d'autres facteurs sur le rendement de greffage a également été évaluée notamment le temps de greffage, la température et le rapport APTS/PEOS. Les conditions de greffage ont été calquées sur les conditions optimales résultantes de l'optimisation par approche chimiométrique obtenues avec les NPCC présentant un ratio APTS/PEOS de 1. Il aurait été plus rigoureux d'effectuer l'approche chimiométrique sur chacun des ratios APTS/PEOS pour obtenir le nombre optimal de protéines greffées par nanoparticule. Les nanoparticules offrant un ratio APTS/PEOS de 0,25 n'ont pas été testées à cause de leur faible stabilité en présence de l' $\alpha$ -lac.

L'influence du temps de greffage sur la quantité d'Ag greffée par NPCC a tout d'abord été évaluée à 20°C pour le ratio APTS/PEOS de 0,5 (Figure 9). Au bout de 75 minutes, 87 % de la valeur maximale du nombre de protéines greffables par NPCC sont atteints. La rapidité de la cinétique de greffage est liée entre autres à la diffusion des espèces réactionnelles et des NPCC ainsi qu'à l'important rapport surface sur volume des NPCC qui favorisent les rencontres entre les réactifs.



**Figure 9. Influence du temps de greffage sur le nombre d'antigènes greffés par nanoparticule (n=3).**

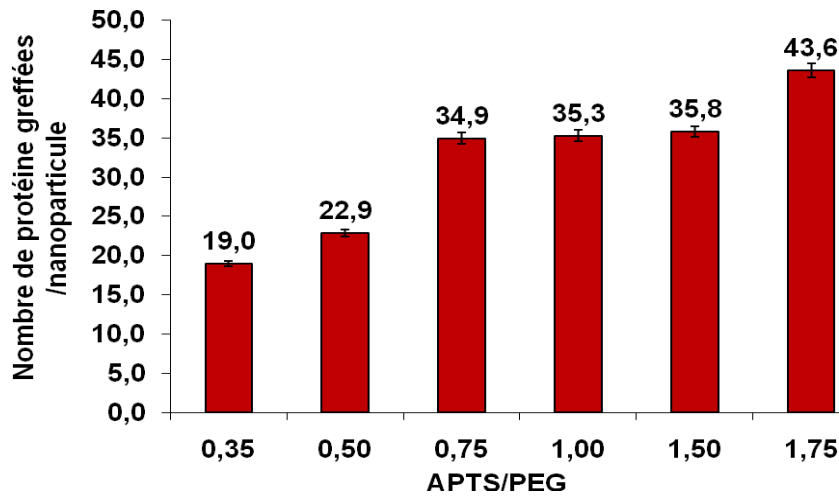
Par la suite, l'influence de la température sur l'efficacité du greffage (Figure 10) a été évaluée pour un type de nanoparticule présentant un ratio APTS/PEOS de 1. Lorsque la température est abaissée de 20 à 4°C, le rendement de greffage diminue, il passe de 21 % (à 20°C) à 15 % (à 4°C). Ce phénomène est expliqué empiriquement par la loi d'Arrhenius. Lorsque la température est supérieure à 25°C, l'agitation thermique des nanoparticules greffées avec l' $\alpha$ -lac augmente favorisant ainsi la formation d'agrégats, de plus à ces températures peut apparaître une dénaturation possible de la protéine ce qui favorise leur précipitation, ainsi le nombre de protéines disponibles pour le greffage diminue.



**Figure 10. Influence de la température sur le nombre d'antigènes greffés à la surface des nanoparticules (n=3).**

Nous nous sommes enfin intéressés à l'influence du rapport APTS/PEOS sur le greffage. Toutes choses étant égales, nous observons que le nombre de protéines greffées par nanoparticule augmente avec le ratio APTS/PEOS. Plus le nombre d'APTS introduit pendant la synthèse augmente, plus le nombre de groupements amines de surface augmente favorisant ainsi le greffage covalent de l' $\alpha$ -lac par liaisons amides (Figure 11). Cependant un plateau est observé pour les ratios allant de 0,75 à 1,5. Comme nous l'avons évoqué pour le tableau 1, le nombre d'amines augmente à la surface de la coquille de silice pour les ratios allant de 0,35 à 1,5 mais il est possible que le nombre de PEG ne diminue pas (résultats non démontrés pour le moment), il y aurait donc une gêne stérique et le nombre de protéines greffables atteindrait son maximum dès le ratio 0,75. Pour le ratio 1,75, l'excès d'APTS est suffisant pour empêcher le greffage des PEG à la surface des

nanoparticules ce qui libère de la place pour la protéine d'où une nouvelle augmentation du nombre de protéines greffées.



**Figure 11. Evolution du nombre de protéines greffées par nanoparticule en fonction du ratio APTS/PEOS. Les conditions de greffage sont les conditions optimales (n=3).**

Au final, les conditions retenues pour le greffage sont les suivantes :  $[\text{EDC}]/[\alpha\text{-Lac}] = 25$  ;  $[\text{NHS}]/[\text{EDC}] = 1,55$  ;  $[\alpha\text{-Lac}] = 24,85 \text{ nmol/mL}$ , le greffage se déroule sur 15 heures à  $20^\circ\text{C}$ . Deux valeurs du rapport APTS/PEOS : 0,35 et 1 ont été choisies pour la suite de l'étude afin de montrer leur influence sur la spécificité de l'immunoessai comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Ainsi, les deux types de nanoparticules utilisés présentent une densité de greffage de 18 ( $0,005 \text{ Ag/nm}^2$ ) et 35  $\text{Ag/NPCC}$  ( $0,01 \text{ Ag/nm}^2$ ). Ces conditions optimales de greffage ont permis d'obtenir des NPCC-Ag d'environ 45 nm de diamètre physique qui conservent leur caractère colloïdal malgré la saturation de leur surface par l'Ag. Ce dernier conserve sa réactivité spécifique envers son Ac.

## V°) Conclusion

Une nanoplateforme de type cœur-coquille a été synthétisée en tant que support de l'interaction Ag-Ac. Le cœur paramagnétique d'oxyde de fer permet de confiner ces objets sous champ magnétique. La fonctionnalisation de leur surface via des groupements PEG permet la stabilisation des nanoparticules en solution ainsi que la diminution des interactions non spécifiques de biomolécules interférentes par gêne stérique. Les groupements amines assurent la répulsion électrostatique entre NPCC ainsi que le greffage covalent de biomolécules. Des études menées sur la taille et la charge ont montré que ces particules ont un diamètre physique de 35 nm et que la charge globale de surface est positive et varie selon le ratio APTS/PEOS utilisé durant la synthèse. De même, le nombre des groupements amines par nanoparticule est ajustable de 1000 à 5000 groupements environ. Cette valeur a été déterminée par le test à la ninhydrine, en parallèle des études menées en ECZ et en zétamétrie ont permis de corrélérer ce nombre de groupements  $\text{NH}_2$  avec une mobilité électrophorétique ce qui a validé l'EC comme outil de caractérisation de ces NPCC.

Suite à la synthèse et à la caractérisation des NPCC, un protocole d'optimisation de greffage de l'Ag : l' $\alpha$ -lac a été élaboré par l'approche des plans d'expériences. Un premier plan d'expériences a permis de localiser le domaine dans lequel se trouvent les valeurs optimales des facteurs influençant le greffage. Le second, défini sur un domaine restreint issu du premier plan d'expériences a permis de déterminer précisément les valeurs optimales de chacun des facteurs étudiés :  $[\text{EDC}]/[\alpha\text{-lac}]$ ,  $[\text{EDC}]/[\text{NHS}]$  et  $[\alpha\text{-lac}]$ . L'étude de la stabilité colloïdale a montré que les tampons acides favorisaient la stabilité des NPCC greffées par l'Ag. En effet, le pI de la protéine étant de 4,5, les pH se situant au dessous de cette valeur permettent d'obtenir une charge globalement positive des NPCC-Ag ce qui assure leurs répulsions électrostatiques. Au final, l'Ag greffé de façon covalente n'est pas dénaturé et assure la reconnaissance spécifique de son Ac.

Nous allons dans le prochain chapitre nous intéresser à l'utilisation des NPCC pour leur application dans le diagnostic de l'allergie et évaluer leur potentiel par rapport à d'autres supports macro et micrométriques.

## Références bibliographiques

- [1] T. Georgelin. Thèse de doctorat. Nanoparticules multifonctionnelles et traitements anticancéreux : couplage de la bléomycine à la surface de nanoparticules magnétiques. Université Pierre et Marie Curie, **2010**.
- [2] S. S. Papell. US Patent no. 3 215572, **1965**.
- [3] E. E. Rosensweig EE. US Patent no. 3 917 538, **1975**
- [4] H. Deng, X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen, Y. Li. *Angew Chem Int. Ed.* **2005**, 44, 2782-2785.
- [5] N. Feltin, M. P. Pileni *Langmuir* **1997**, 13, 3927- 3933.
- [6] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na. *J Am Chem Soc.* **2001**,123, 12798-12801.
- [7] W. Cai, J. J. Wan *Colloid Interface Sci.* **2007**, 305, 366-370.
- [8] R. Massart, V. Cabuil *J Chem Phys.* **1987**, 84, 967-973.
- [9] S. Mornet. Thèse de doctorat. Synthèse et modifications chimiques à la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'applications biomédicales. Université Bordeaux 1. **2002** ; 59-63.
- [10] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet *J Mater Chem.* **2004**, 14, 2161-2175.
- [11] Y.-M. Huh, Y.-W. Jun, H.-T. Song, S. Kim, J.-S. Choi, J.-H. Lee, S. Yoon, K.-S. Kim, J.-S. Shin, J.-S. Suh, J. Cheon. *J Am Chem Soc.* 2005, 127, 12387-12391.
- [12] S. De Monredon. Thèse de doctorat. Interaction Organosilanes / Silice de précipitation. Du milieu hydroalcoolique au milieu aqueux. Université Pierre et Marie Curie. **2004**.
- [13] G. Deng, M. A. Markowitz, P. R. Kust, B. P. Gaber. *Materials Science and Engineering C* **2000**, 11, 165– 172.
- [14] D. K.Yi, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, J. Y. Ying *Chem Mater.* **2006**, 18, 614-619.
- [15] S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard, W. Tan *Langmuir* **2001**, 17, 2900-2906.
- [16] W. Stöber, A. Fink, E. J. Bohn *J Colloid Interface* **1968**, 26, 62.

- [17] Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers, Y. Xia. *Nano Lett.* **2002**, 2, 183-186.
- [18] A. P. Philipse, M. P. B. van Bruggen, C. Pathmamanoharan. *Langmuir* **1994**, 10, 92-99.
- [19] C. J. Brinker, G. W. Scherer. *Sol-Gel Science*. Academic Press **1990**, 97-235.
- [20] W. Stöber, A. Fink, E. J. Bohn. *J Colloid Interface* **1968**, 26, 62.
- [21] F. d'Orlyé, A. Varenne, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil. *Electrophoresis* **2009**, 30, 2572–2582.
- [22] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich. **1985**
- [23] S. Krishnamurthy, P. Bhattacharya, P. E. Phelan. *nano lett.* **2006** 3 419-423.
- [24] G. A. Vliegthart, H. N. W. Lekkerkerker. *J Chem Phys.* **1999**, 111, 4153-4157.
- [25] E. Boschetti, M. Delay, *science tools* **1978**, 25, 18.
- [26] R. Axen, J. Porath, S. Ernback, *nature* **1967**, 214, 1302.
- [27] J. K. Inman, *Meth. Enzymol.* **1974**, 34, 30.
- [28] C. J. Sanderson, D. V. Wilson. *Immunology* **1971**, 20, 1061.
- [29] J. Turkova. *affinity chromatography* **1978**, 155.
- [30] V. Pichon, L. Chen, M.C. Hennion, R. Daniel, A. Martel, F. Le Goffic, J. Abian, D. Barcelo. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2451 -2460.
- [31] A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon. *J. Chromatogr. B* **2010**, 878, 213–221.
- [32] N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion. *J. Chromatogr. B* **2000**, 745 15 –37.
- [33] M.-C. Hennion, V. Pichon. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000 29–52.
- [34] C. Maisonnette, P. Simon, M.-C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1120, 185.



# **CHAPITRE 3 :**

## **DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNOESSAI EN BATCH UTILISANT DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES ET DEDIE AU DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE**

### **I°) Introduction**

Nous avons évoqué dans le chapitre précédent la synthèse et la caractérisation des NPCC ainsi que le greffage de la molécule de capture à leur surface. Nous avons souligné le fait que ces NPCC greffées conservent leur stabilité colloïdale et que l'Ag immobilisé n'est pas dégradé, permettant ainsi la capture spécifique de l'Ac cible.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'immunoessai complet développé en batch et dédié au diagnostic de l'allergie. Cet immunoessai est de type indirect non compétitif et a été élaboré en utilisant un composé modèle de type IgG pour des raisons pratiques et financières. Dans un premier temps et afin de démontrer l'intérêt d'utiliser une nanoplateforme pour améliorer les performances de l'immunoessai, un modèle cinétique a été mis en oeuvre en collaboration avec Frederic Kanoufi (laboratoire PECSA) pour comparer les cinétiques d'interaction entre l'Ag et l'Ac cible (IgG) pour trois différents supports : les plaques de microtitration ont été utilisées pour représenter l'échelle millimétrique, des billes micrométriques pour l'échelle micrométrique et les NPCC pour l'échelle nanométrique. Ce modèle a également permis de mettre en lumière l'influence de certains paramètres tels que la force ionique ou encore la concentration en NPCC sur l'affinité entre l'Ag et l'Ac.

L'un des intérêts de ces NPCC réside dans la possibilité de pouvoir modifier leur chimie de surface. Nous avons donc étudié l'influence de cette chimie de surface sur deux paramètres : la capacité de capture de l'Ac cible et la spécificité de l'interaction. Pour cela, deux types de NPCC présentant un rapport APTS/PEOS de 0,35 et 1 ont été utilisés. Le type de NPCC présentant la meilleure capacité et spécificité de capture a par la suite été choisi pour élaborer la courbe de calibration du composé



modèle (IgG) afin de comparer les domaines de linéarité et les limites de détection en utilisant les NPCC et les microplaques, ces dernières étant considérées comme le système de référence.

Enfin, l'utilisation des NPCC en tant que support de l'immunoessai dédié au diagnostic de l'allergie a été démontrée en dosant la quantité d'IgE présentes dans des sérums de patients allergiques au lait. Ce taux d'IgE a été mesuré en parallèle par un ELISA en microplaque afin de comparer les performances analytiques des deux supports et ainsi valider, à l'aide d'une méthode de référence, les NPCC en tant qu'outil de diagnostic.

**II°) Article 2 :**

**Kinetic analyses and performances of a colloidal  
magnetic nanoparticles-based immunoassay  
dedicated to allergy diagnosis**

**Article accepté dans analytical bioanalytical chemistry**

Bruno Teste<sup>1</sup>, Frédéric Kanoufi\*<sup>1</sup>, Stéphanie Descroix\*<sup>1</sup>, Pascal Poncet<sup>1,4</sup> Thomas Georgelin<sup>2</sup>, Jean-Michel Siaugue<sup>2</sup>, Jan Petr<sup>3</sup>, Anne Varenne<sup>3</sup>, Marie-Claire Hennion<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA) UMR 7195  
CNRS-ESPCI-UPMC, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>2</sup> CNRS-UPMC-ESPCI, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>3</sup> CNRS-ENSCP-UPMC, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Chimie Paris Tech, 11 rue  
Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France

<sup>4</sup> Institut Pasteur 25-28 rue du Docteur Roux 75015 Paris, France

Corresponding authors :

\*Frederic Kanoufi : frederic.kanoufi@espci.fr

\*Stephanie Descroix: stephanie.descroix@espci.fr

## Abstract

In this paper, we demonstrate the possibility to use magnetic nanoparticles as immunosupport for allergy diagnosis. Most immunoassays used for research and clinical diagnosis are based on heterogeneous solid phase system and suffering from mass transfer limitation. The nanoparticles colloidal behavior and magnetic properties bring the advantages of homogeneous immunoassay i.e. species diffusion and of heterogeneous immunoassay, *i.e.* easy separation of the immunocomplex and free forms as well as analyte preconcentration. We thus developed a colloidal non-competitive indirect immunoassay using magnetic core shell nanoparticles (MCSNP) as immunosupport. The feasibility of such immunoassay was first demonstrated with a model antibody and described by comparing the immunocapture kinetics using macro (standard microtiter plate), micro (microparticles) and nanosupports (MCSNP). The influence of the nanosupport properties (surface chemistry, antigen density) and of the medium (ionic strength, counter ions nature) on the immunocapture efficiency and specificity was then investigated. The performances of this original MCSNP-based immunoassay were compared with a gold standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using microtiter plate. The capture rate of target IgG was accelerated 200-fold and a 10-fold lower limit of detection was achieved. Finally the MCSNP-based immunoassay was successfully applied to the detection of specific IgE from milk allergic patient's sera with a lower LOD and a good agreement ( $CV < 6\%$ ) with microtiter plate confirming the great potential of this analytical platform in the field of immunodiagnosis.

**Keywords:** Allergy diagnosis; IgE; Colloidal immunoassay; Kinetic reaction; Magnetic core shell nanoparticles.

## Introduction

Allergy is an “abnormal” immune reaction due to sensitization to molecules called allergens. Almost 30 % of the population in western countries is affected by allergy [1]. Allergic reaction can induce classical symptoms (gastrointestinal, respiratory and cutaneous) as well as extreme situations called anaphylactic shock. A first exposure to allergens may lead to immunoglobulin E (IgE) production. In further contact with these specific allergens, mast cells and basophiles may be activated and release inflammatory and immune mediators leading to allergic

symptoms. Specific IgE concentration can thus be considered as a relevant biomarker for *in-vitro* allergy diagnosis. Immunoassays are techniques based on the specific binding of antibody (Ab) to antigen (Ag) in order to quantify them. According to the detection used (enzymatic, fluorescent or radioactive) these techniques can reach high sensitivity. Among them, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using microtiter plate is a heterogeneous immunoassay and is often considered as a gold standard for allergy diagnosis to determine IgE concentration and their specificity to one single allergen, to a given mixture or to a crude extract of an allergenic source. *In-vitro* tests such as ImmunoCap® are also commercially available for the detection of IgE.

The main limitation of ELISA using microtiter plate is related to the diffusion of a single partner, the second one being immobilized on the solid surface, which leads to low rate of immunological capture and long analysis times because of high diffusion distances. To overcome these problems, one has to increase the mass-transfer of the target toward the immobilized receptor. This may be achieved by using controlled convective mass-transfer rates [2] which are particularly easy to control in microfluidic devices [3,4]. Another approach consists in miniaturizing the dimension of the analytical system [5] and handling micrometric or sub-micrometric spherical immunosupport. Indeed the decrease of the dimension of the sink allows the fast establishment of steady-state delivery of reactants under mass-transfer rates which increases as the inverse of the support dimension. Kitamori *et al.* combined both approaches and developed a miniaturized ELISA for carcinoembryonic Ag analysis [6]. Immunoreactions were performed on packed polystyrene beads within a microchannel, thus reducing the diffusion length and shortening the overall analysis time from 45 h to 35 min. These investigations were continued using this micro-ELISA system for sensitive and rapid allergy diagnosis [7]. Magnetic beads were also used for their magnetic properties to facilitate separations of the immune complex and free forms under magnetic field [8-12]. Yang *et al.* have reported a multiplex chemiluminescent immunoassay based on the immobilization of capture Ab on glass tube and on paramagnetic microbeads to detect simultaneously carcinoembryogenic Ag and  $\alpha$ -fetoprotein [13]. In parallel, Kwon *et al.* have proposed the use of streptavidin-coated magnetic beads to enable automation and improve the sensitivity of their immunoassay dedicated to toxins detection [14]. In the field of microfluidic, an approach using magnetic beads has been recently developed by Peyman *et al.*, the IgE measurement was based on the magnetophoretic deflection velocity of microbeads that is proportional to the number of captured analyte under magnetic field in the microchannel [15]. In cow's milk allergy diagnosis context, Chen *et al.* have developed a method combining magnetic beads based

immunoaffinity to a separation using capillary electrophoresis [16]. Even if the beads offer a better accessibility to grafted molecules as well as an increased surface to volume ratio, these analyses are performed in heterogeneous phase since the micrometric beads aggregate rapidly and are confined within the microchannel. In these conditions, beads surface is not fully exploited.

Decreasing the immunosupport dimensions down to the nanometer scale is challenging for many research areas and particularly for biological technologies. As first stated, with the decrease of the immunosupport dimension comes the increase of mass-transfer rates and the access to higher kinetics. It has also been shown that interaction between a nanoparticle and a chemical receptor may lead to an increase of the affinity of a target binding [17, 18] likely because such system may resemble homogeneous liquid phase systems. In order to combine the advantages of homogeneous and heterogeneous assays, colloidal nanoparticles have been used as immunosupport and more recently with sub-100 nm nanoparticle-based colloidal immunoassay mostly described with organic [19-21], gold [22, 23] or iron-oxide magnetic nanoparticles [24, 25]. The immunospecificity of the nanoparticles may be analyzed by standard surface-plasmon resonance (SPR) technique [26]. Lin *et al.* combined Ab-conjugated magnetic nanoparticles as affinity probes with MALDI-MS detection [27] to perform multiplexing. Recently, Tang *et al.* have used both magnetic and non magnetic fluorescent silica nanoparticles to develop a competitive immunoassay for aflatoxin B1 detection in an automated approach [28]. In parallel many papers have reported the use of gold nanoparticles as nanoprobe to perform the immunoassay detection and to improve its sensitivity. Among them, electrochemical as well as light scattering detections have been widely described [29–32].

In this context, we have designed magnetic core-shell nanoparticles (MCSNP) consisting in a core of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  encapsulated in a silica shell functionalized with polyethylene glycol (PEG) chains and amino groups which allow MCSNP colloidal stability and efficient covalent immobilization of biomolecules [33, 34]. Recently, we have successfully used these nanoparticles as therapeutic nanoplatform for anticancer drug delivery [35]. These MCSNP have been widely characterized by different techniques especially by capillary electrophoresis [36, 37]. They offer paramagnetic properties which, associated with the high colloidal stability for months without clustering or sedimenting, could be beneficial for the development of immunoassays that could mimic homogeneous liquid phase immune reactions.

This paper reports the development of a colloidal immunoassay dedicated to allergy diagnosis. Due to their colloidal and magnetic properties as well as to the high surface to volume ratio that can be

achieved, MCSNP are interesting candidate as immunosupport in order to reduce analysis time, improve sensitivity and mimic homogeneous liquid phase immune interactions. Moreover, the possibility to control their surface in terms of repellent moieties or quantity of immobilized Ag induces interesting degrees of freedom to optimize an immunoassay. The grafting of a major cow's milk allergen:  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -lac) on MCSNP has been optimized by experimental design and it has been shown that colloidal stability was maintained while the Ag was not denatured [38]. First, the kinetic of the immunocapture reaction have been analyzed through dedicated adsorption models allowing to compare the immunocapture kinetics when decreasing the immunosupport dimension from mm (standard microtiter plate) to micrometer with magnetic microparticles, to the nm scale with MCSNP. To demonstrate the feasibility of using such a nanoplatform for allergy diagnosis, a non-competitive indirect immunoassay was designed for the determination of a model analyte: anti  $\alpha$ -lac immunoglobulin (Ig) G. Following the optimization of the immunoreaction conditions (nanoparticles surface chemistry, Ag density and buffer properties), the performances of the nanoparticle-based immunoassay system were estimated and compared to gold standard ELISA in microtiter plate in terms of assay time and sensitivity. The applicability of the developed colloidal immunoassay for cow's milk allergy diagnosis was evaluated with specific IgE determination in sera from allergic patients to demonstrate that MCSNP-based immunoassay can be used for diagnosis of clinical relevance.

## Materials and methods

### Chemicals

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS), 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid sodium salt (MOPS), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt (MES), tetraethoxyorthosilicate (TEOS), 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTS),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -lac) from bovine milk, *o*-phenylenediamine (OPD), *p*-Nitrophenyl Phosphate (pNPP), anti-Human IgE-Alkaline phosphatase (anti-IgE-AP), polyvinylpyrrolidone (PVP) and polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween 20) were from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]-trimethoxysilane (PEOS) containing 3-6 ethylene oxide groups was from Gelest (Morrisville, PA, USA). Goat polyclonal anti- $\alpha$ -lac IgG (AbI), goat polyclonal anti- $\alpha$ -lac IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (AbI-HRP) and rabbit polyclonal anti-goat IgG conjugated to HRP

(AbII-HRP) were from GeneTex<sup>®</sup> Inc (Irvine, CA, USA). Goat polyclonal anti-rabbit IgG antibodies conjugated to HRP (non-specific Ab) were from Biosys Technology (Paris, France). Potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), disodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sodium chloride (NaCl), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl (2 M) and NaOH (2 M) were from VWR (Strasbourg, France). 96-well microtiter plates were from Greiner BioOne (Courtaboeuf, France). 2 mL Eppendorf tubes were from Eppendorf AG (Hamburg, Germany). Amino magnetic particles (4 $\mu$ m) were from Gentaur (Paris, France).

### Buffer preparation

Ag immobilization buffer: MOPS buffer at pH 7.5 and 10 mM ionic strength contained 15 mM MOPS and 10 mM NaOH. Immunoreaction buffers: the influence of different buffers on immunoreactions was tested. Phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.5 contained 137 mM NaCl, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 7.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The phosphate buffer (PB) at pH 7.5 contained 10.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 46.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. For these buffers, the final ionic strength was 150 mM and Tween 20 (0.1% (v/v)) was added. IgG detection buffer: OPD substrate (0.25 mg mL<sup>-1</sup> final concentration) was prepared in a 100 mM ionic strength citrate buffer at pH 5 made of 25 mM citric acid, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.06 % w/v). IgE detection buffer: pNPP substrate (1 mg mL<sup>-1</sup> final concentration) was prepared in 200 mM ionic strength Tris buffer at pH 7.2.

### Apparatus

All rinsing steps were performed using a Sigma 2K 15 centrifuge from Mediatech Scientific (Clamart, France) or MS column with MACS separator magnet from Miltenyi (Paris, France). MCSNP hydrodynamic diameter measurements were performed using dynamic light scattering with a Nano ZS Zetasizer (Malvern Instrument, Worcestershire, UK). Solution absorbance was read using a SpectraMaxM2 microtiter plate reader from Molecular Devices (St Grégoire, France). Rotary disk agitator SB3 and ultrasonic 45 Hz wave cleaner were from VWR (Strasbourg, France).

### Magnetic core shell nanoparticles synthesis

MCSNP synthesis has been previously reported [33]. Briefly, maghemite nanoparticles (mean physical diameter 7 nm) were prepared by co-precipitation of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions under alkaline conditions. Nanoparticles were coated by citrate anions and dispersed in water. These maghemite nanoparticles were encapsulated in silica shells prepared by condensation of TEOS, in ethanolic medium in the presence of ammonia as catalyst. The silica shell functionalization was carried out by simultaneous condensation of a silica amine-derived compound (APTS) and a silica polyethyleneglycol (PEG)-derived compound (PEOS). The concurrent addition of a small amount of TEOS resulted in the formation of a cross-linked silica shell. The particle surface chemistry can be tuned by varying the PEOS to APTS molar ratio, the amount of PEOS remaining constant while the quantity of APTS increases. The ratio used was a 1:1 and 3:1 PEOS/APTS ratio denoted MCSNP1 and MCSNP2 respectively. The reaction of silica condensation was carried out overnight and the particle suspension was destabilized with diethyl ether. A red pellet was formed and separated by magnetic settling. The pellet was washed twice with a mixture of diethyl ether and ethanol (15:1) and redispersed in 10 mM MOPS buffer (pH 7.5). This colloidal solution of amino-PEG functionalized MCSNP (approximately  $3.3 \times 10^{14}$  MCSNP  $\text{mL}^{-1}$ ) was stable for months.

### $\alpha$ -Lactalbumin antigen immobilization on immunosupports

The optimization of  $\alpha$ -lac grafting on MCSNP was previously reported [38]. Briefly 350  $\mu\text{L}$  of MCSNP solution ( $3.3 \times 10^{14}$  MCSNP/mL) were mixed with 200  $\mu\text{L}$  of EDC (0.42 mg/mL), 200  $\mu\text{L}$  of NHS (0.80 mg/mL) and 400  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -lac solution (1 mg/mL) in a 2 mL Eppendorf tube. Each reagent solution was freshly prepared in 10 mM MOPS buffer at pH 7.5. All tubes were gently shaken at 20°C for 15 h. The MCSNP grafted with  $\alpha$ -lac Ag (MCSNP-Ag) were rinsed 3 times with 400  $\mu\text{L}$  of 10 mM MOPS buffer using centrifugation (15,000 g/5 min) or a MACS separator column. Finally, MCSNP-Ag were resolubilized in 400  $\mu\text{L}$  of immunoreaction buffer using ultrasonic wave for 30 s to facilitate MCSNP solubilization and prevent any cluster formation. Concerning Ag immobilization on microparticles, a volume of 100  $\mu\text{l}$  of 4  $\mu\text{m}$  diameter magnetic particles ( $5 \times 10^8$  particles /mL) with amino groups on the surface were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of EDC at 50 mg/mL, 100  $\mu\text{L}$  of NHS at 15 mg/mL and 400  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -lac at 1 mg/mL in a 2 mL Eppendorf tube. All solutions were freshly prepared in 10 mM MOPS buffer at pH 7.5 and the tubes were gently shaken at 20°C for 15 h. The particles were then isolated by applying a permanent magnet



and rinsed three times with 400  $\mu\text{L}$  of 10 mM MOPS at pH 7.5. The particles were resuspended in 800  $\mu\text{L}$  of 150 mM PBS at pH 7.5 with 0.1% (v/v) Tween.

The immobilization of the Ag onto microtiter plate wells were performed by adding 100  $\mu\text{L}$  of a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\alpha$ -lac solution prepared in a 10 mM MOPS buffer for 15 h at 4°C. Then the wells were rinsed three times with 200  $\mu\text{L}$  of 10 mM MOPS buffer at pH 7.5.

#### Antigen-antibody reaction kinetic

The study concerning reaction kinetics was performed using grafted  $\alpha$ -Lac Ag and AbI-HRP. The reactions were performed in 150 mM PBS at pH 7.5 with 0.1% (v/v) Tween. At macroscale, 100  $\mu\text{L}$  of AbI at 10 ng/mL were added in each well previously functionalized with Ag. Incubation time was varied from 1 to 900 min. At microscale, 400  $\mu\text{L}$  of particles grafted with Ag ( $3 \times 10^{-6}$  M) were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of AbI-HRP (10 ng/mL final concentration). At nanoscale, 400  $\mu\text{L}$  of MCSNP-Ag at a concentration of  $3 \times 10^{-6}$  M were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of AbI (10 ng/mL final concentration). For both micro and nanoparticles, reaction time was varied from 1 to 120 min. After incubation, macro, micro and nanosupport were rinsed three times with 150 mM PBS at pH 7.5 with 0.1% (v/v) Tween. Both kinds of particles were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of citrate buffer. For each support 100  $\mu\text{L}$  of IgG detection buffer (0.25 mg/mL OPD final concentration) were added to quantify the number of captured AbI-HRP. After 30 min, 50  $\mu\text{L}$  of 2M HCl were added and 150  $\mu\text{L}$  from the supernatant was read at 490 nm after removing the particles. For the kinetic analysis with the microparticles and MCSNP, 5 min were necessary for the confinement and rinsing step. Ag/Ab interaction still occurs during this time. Thus, the times used in the kinetic analysis correspond to the incubation time plus the 5 min concerning the confinement/rinsing process.

#### Immunoassay procedure using magnetic core shell nanoparticles

The performances of the MCSNP-based immunoassay were compared with that of conventional microtiter plate. The same immunological system was used:  $\alpha$ -lac (Ag), goat polyclonal anti  $\alpha$ -lac IgG (AbI) and HRP-conjugated polyclonal rabbit anti-goat IgG (AbII-HRP). In both systems the detection step consisted in adding HRP substrate (OPD) and measuring the colored product absorbance.

In the nanoparticle system, the immunoassay was performed at the surface of MCSNP-Ag and reactions occur in 2 mL Eppendorf tube. First, 400  $\mu\text{L}$  of MCSNP-Ag ( $3 \times 10^{-6}$  M) were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of AbI solution at different concentrations (0.03 to 10,000 ng/mL final concentration) in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) for a given incubation time (5 or 120 min), MCSNP were then rinsed 3 times with 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) using centrifugation (15,000 g/ 5 min) or MS column, resolubilized in 400  $\mu\text{L}$  of 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) and 50  $\mu\text{L}$  of AbII-HRP solution (2,000 ng/mL final concentration) were added (5 or 120 min incubation time). The background level was evaluated applying the same procedure but replacing the AbI by 50  $\mu\text{L}$  of PBS. The MCSNP were then washed 3 times and finally resolubilized in 100  $\mu\text{L}$  of 100 mM citrate buffer at pH 5. The detection was carried out by mixing MCSNP-Ag with 100  $\mu\text{L}$  of IgG detection buffer (0.25 mg/mL OPD final concentration). The HRP catalytic reaction was stopped with 50  $\mu\text{L}$  of 2 M HCl after 10 or 30 min incubation. Finally, MCSNP were discarded to prevent any scattering effect and 150  $\mu\text{L}$  from the supernatant was read at 490 nm. All the steps were made in thermoregulated conditions (22°C).

For serum IgE evaluation, 400  $\mu\text{L}$  of MCSNP-Ag ( $3 \times 10^{-6}$  M) were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of reference (diluted from 20 to 1000 times) or unknown (diluted 30 times) sera from cow's milk allergic patient in 150 mM PBS-Tween (0.1%v/v) for 2 h. After washing, MCSNP were resuspended in 400  $\mu\text{L}$  of 150 mM PBS-Tween (0.1%v/v) and 50  $\mu\text{L}$  of anti-IgE-AP (1000 ng/mL final concentration) was added for 1 h incubation. Finally MCSNP were rinsed again and resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of Tris buffer at pH 7.2, detection was made by adding 100  $\mu\text{L}$  of pNPP (1 mg/mL final concentration) for 1h. Colored product was measured at 405 nm. The washing step was the same as those of previous AbI determination.

#### Enzyme linked immunoassay procedure in microtiter plate

A volume of 200  $\mu\text{L}$  of 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) containing PVP (1% w/v) were added in each well for blocking step (2 h incubation). Then, 100  $\mu\text{L}$  of AbI solution in 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) at various concentrations (0.1 to 10,000 ng/mL) were added to each well (2 h incubation). 200  $\mu\text{L}$  of 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) were used 3 times for the washing step. Then, 100  $\mu\text{L}$  of 2,000 ng/mL AbII-HRP prepared in 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) were added. After 1 h incubation, the plate was washed 3 times to remove unbound Ab and 100  $\mu\text{L}$  of IgG detection buffer were added to the wells. After 30 min, the HRP catalytic reaction was stopped with

50  $\mu\text{L}$  of 2 M HCl. Finally, the absorbance was measured at 490 nm. All the reactions were performed in thermoregulated conditions (22°C).

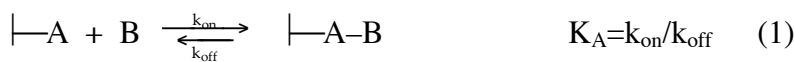
IgE determination in serum was carried out in the same conditions mentioned in the previous procedure. 100  $\mu\text{L}$  of serum from cow's milk allergic patient diluted from 20 to 1000 times (reference serum) and 30 times (unknown sera) were added for 2h incubation. 100  $\mu\text{L}$  of anti-IgE-AP (1000 ng/mL) was then added for 1 h incubation and followed by 100  $\mu\text{L}$  of pNPP (1 mg/mL) for 1h. Washing was performed before each incubation. Colored product was measured at 405 nm.

## Results

### Model of immunological reaction kinetics

#### Presentation

In this work, we have compared the extent of Ag-Ab reactions using three different immunological supports which allow to describe such reactions at three different scales ranging from the mm (microtiter plate) to the  $\mu\text{m}$  (microparticles) down to 35 nm MCSNP. The present section recalls the expected immunological response kinetics for the different supports. The immunological response is characterized by a bimolecular reaction between an Ag molecule,  $A=\text{Ag}$ , immobilized on the surface of the dedicated support, and an active Ab entity,  $B=\text{Ab}$ , freely diffusing in solution. The model usually proposed to describe such reaction (1) is based on the Langmuir isotherm model.



Such Langmuir isotherm model of adsorption/desorption processes is given by (2) where  $\Gamma_A$  and  $\Gamma_{AB}$  represent the surface concentration of respectively the Ag and Ag-Ab adduct;  $C_B^s$  is the concentration of B at the interface between the solution and the immunosupport surface; the kinetics of the adsorption and of the desorption stages are characterized by their respective rate constants,  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$ . The ratio of these two constants  $k_{\text{on}}/k_{\text{off}} = K_A$  determines the equilibrium constant of the immunological reaction defined in (1).

$$\frac{d\Gamma_{AB}}{dt} = k_{\text{on}} \Gamma_A C_B^s - k_{\text{off}} \Gamma_{AB} = k_{\text{off}} (K_A (\Gamma^0 - \Gamma_{AB}) C_B^s - \Gamma_{AB}) \quad (2)$$

During the immunological reaction, the immunosupport surfaces are initially fully-covered by A, with a maximum surface concentration  $\Gamma^0$ , and B is progressively covering the surface,  $\Gamma_{AB}$  increases or  $\Gamma^0 - \Gamma_{AB}$  decreases, until an equilibrium is reached where the reactions of all species are related to  $K_A$ :

$$K_A = \frac{\Gamma_{AB,eq}}{(\Gamma^0 - \Gamma_{AB,eq})C_{B,eq}} \quad (3)$$

In the experiments presented below the amount of Ag immobilized on the immunosupports is always in large excess compared to the amount of Ab available in solution, the surface coverage by the Ag-Ab adduct is then negligible compared to that of Ag ( $\Gamma^0 \gg \Gamma_{AB}$ ) while the solution is exhausted in B. The consumption of B in the solution is accounted by the mass-conservation equation (4a) relating the amount, in mole, of B in solution,  $n_B$  (initial solution amount  $n_B^0$ ) and the amount of B engaged in the adduct,  $n_{AB}$ , at the immunosupport of surface area S (where in mole,  $n_{AB} = \Gamma_{AB}S$ ).

$$n_B^0 = n_{AB} + n_B \quad (4)$$

The mass conservation is more generally obtained (4a) from integration of the local concentration of B over the whole solution volume V, and yields at equilibrium its right hand expression:

$$n^0 = n_{AB} + \int_V C_B dV = n_{AB}^{eq} + C_B^{eq}V \quad (4a)$$

The consumption of B is sustained by diffusive transport from the solution to the immunosupport. As diffusion is a rather slow process it may govern the overall immunological process kinetics and its impact is accounted in (5) when considering that the diffusion process follows Nernst approximation within a diffusion layer of thickness  $\delta$ :

$$\frac{d\Gamma_{AB}}{dt} = k_{off}(K_A \Gamma^0 C_B^s - \Gamma_{AB}) = D \frac{C_B^b - C_B^s}{\delta} \quad (5)$$

where D is the diffusion coefficient of the solution species and  $C_B^b$  corresponds to the concentration of B in the homogenized solution. The general theoretical immunological response for large excess of immobilized A is then obtained from resolution of (5) associated with the mass-conservation (4). It depends on the contribution of diffusion actually related to the dimension of the immunosupport. It is anticipated that at the macroscale, in microtiter plates, the diffusion layer increases as the square-root of time  $\delta \sim (2Dt)^{1/2}$  as deeper regions of the solution are exhausted as time passes. For

the microscale, and even more, for the nanoscale platforms the diffusion layer around micro- and sub-micrometric spherical object is of the order of the dimension of the object, few micro- or tens of nanometer respectively. For diffusion coefficient of the order of  $D \sim 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$  (typical of proteins), the time required for diffusive transport within a  $\delta \sim 2 \mu\text{m}$  layer is  $t \sim \delta^2/2D = 0.2 \text{ s}$  indicating that diffusion is not kinetically limiting for the microparticles and the core shell nanoparticles as long as they provide immunological responses within times longer than few seconds.

### *Immunological reaction with consumption but no diffusion limitation*

When diffusion processes are not limiting the right-hand side of (5) is not considered and  $C_B^s = C_B^b$  and (4) and (5) may be more easily expressed in term of  $n_{AB}$  (6a):

$$\frac{dn_{AB}}{dt} = k_{\text{off}} \left( K_A n_A^0 \frac{n_B^0 - n_{AB}}{V} - n_{AB} \right) \quad (6a)$$

or equally in term of  $\chi = n_{AB}/n_B^0$  the ratio of B captured (7a):

$$\frac{d\chi}{dt} = k_{\text{off}} \left( K_A \frac{n_A^0}{V} (1 - \chi) - \chi \right) = k_{\text{off}} \left( K_A \frac{n_A^0}{V} - \chi \left( 1 + K_A \frac{n_A^0}{V} \right) \right) \quad (7a)$$

The resolution of (7a) is straightforward and yields an exponential variation (8a) with an apparent 1<sup>st</sup> order rate constant  $k_{\text{app}}$  defined by (9a) and where  $\chi^{\text{eq}}$  is the equilibrium ratio defined by (10a) from which the association equilibrium constant is readily obtained.

$$\chi = \chi^{\text{eq}} (1 - \exp(-k_{\text{app}} t)) = \chi^{\text{eq}} (1 - \exp(-k_{\text{off}} (1 + K_A \frac{n_A^0}{V}) t)) \quad (8a)$$

$$k_{\text{app}} = k_{\text{off}} (1 + K_A n_A^0 / V) = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} n_A^0 / V \quad (9a)$$

$$\chi^{\text{eq}} = \frac{K_A \frac{n_A^0}{V}}{1 + K_A \frac{n_A^0}{V}} \quad (10a)$$

This equation is similar to that proposed for the description of protein adsorption in static microsystems by Lionello *et al.* [4]. It shows that when increasing the surface to volume ratio the solution exhaustion and consequently the product  $K_A n_A^0 / V = K_A \Gamma^0 S / V$  increases which results in an acceleration of the overall kinetic process,  $k_{\text{app}}$  defined by (9a), when compared to reaction proceeding with negligible solution exhaustion ( $k_{\text{app}} = k_{\text{off}}$ ).

### Immunological response with diffusion limitation

As discussed in the model presentation, diffusion may also perturb the immunological response especially at the macroscale of microtiter plate ELISA tests. The complete resolution of (5)+(4) can be obtained from finite element methods. Analytical expression may also be obtained when considering that the concentration of  $C_B$  in solution increases linearly with the distance from the immunosupport surface where its value is  $C_B^s$  and reaches the bulk concentration,  $C_B^b$ , at the exit of the diffusion layer  $\delta$ . Assuming a linear 1D diffusion from the surface of area  $S$  and along the perpendicular  $z$  direction the mass conservation (4a) is rewritten as:

$$n^0 = n_{AB} + \int_0^\delta (C_B^s + \frac{C_B^b - C_B^s}{\delta} z) S dz + \int_\delta^L C_B^b S dz \quad (4b)$$

where  $L$  is the characteristic longitudinal dimension of the solution defined as the volume to surface ratio  $L=V/S$ . When the consumption of  $B$  in the bulk solution is not critical,  $C_B^b = C_B^0$  and the combination of (4b) and the right-hand sides of (5) yield the differential equation for  $\chi$ :

$$\frac{d\chi}{dt} = k_{off} \frac{K_A \frac{n_A^0}{V} - \chi}{1 + k_{on} \frac{n_A^0 \delta}{SD}} = k_{off} \frac{K_A \frac{n_A^0}{V} - \chi}{1 + Da} \quad (7b)$$

where  $Da$  is the Damköhler (dimensionless) number which characterize the competition between the adsorption and diffusion characteristic times. The complete resolution of (7b) has been given by Bourdillon *et al.* [39] for a stagnant ( $\delta=cst$ ) diffusion layer. It yields a variation of captured  $B$  similar to (8a) with an apparent rate constant  $k_{app}$ , given by (9b), showing that limiting diffusion processes (high  $Da$  values) are slowing down the overall kinetics.

$$k_{app} = k_{off}/(1+Da) \quad (9b)$$

When the diffusion layer expands in the solution according to  $\delta = (2Dt)^{1/2}$ , the denominator of (7b) is time-dependent and the resolution relies on the separate integration of  $\chi$  and  $t$  as proposed in (7c) which yields the time evolution of the ratio of captured  $B$ ,  $\chi$  in (8c) with the time-dependent  $Da(t) =$

$$k_{on} \Gamma^0 \sqrt{\frac{2t}{D}} \text{ and } \chi^{eq} = K_A n_A^0 / V.$$

$$\int \frac{d\chi}{K_A \frac{n_A^0}{V} - \chi} = k_{\text{off}} \int \frac{dt}{1 + k_{\text{on}} n_A^0 \sqrt{\frac{2t}{D}}} \quad (7c)$$

$$\frac{\chi}{\chi^{\text{eq}}} = 1 - \exp\left(-\frac{2k_{\text{off}} t}{Da(t)} \left(1 - \frac{\ln(1 + Da(t))}{Da(t)}\right)\right) \quad (8c)$$

The same treatment applies when B is exhausted from the solution and as long as the diffusion layer expansion is lower than 0.2 L then one obtains the same evolution (8d) but with a faster apparent adsorption rate constant,  $k_{\text{app}}$  given by (9a):

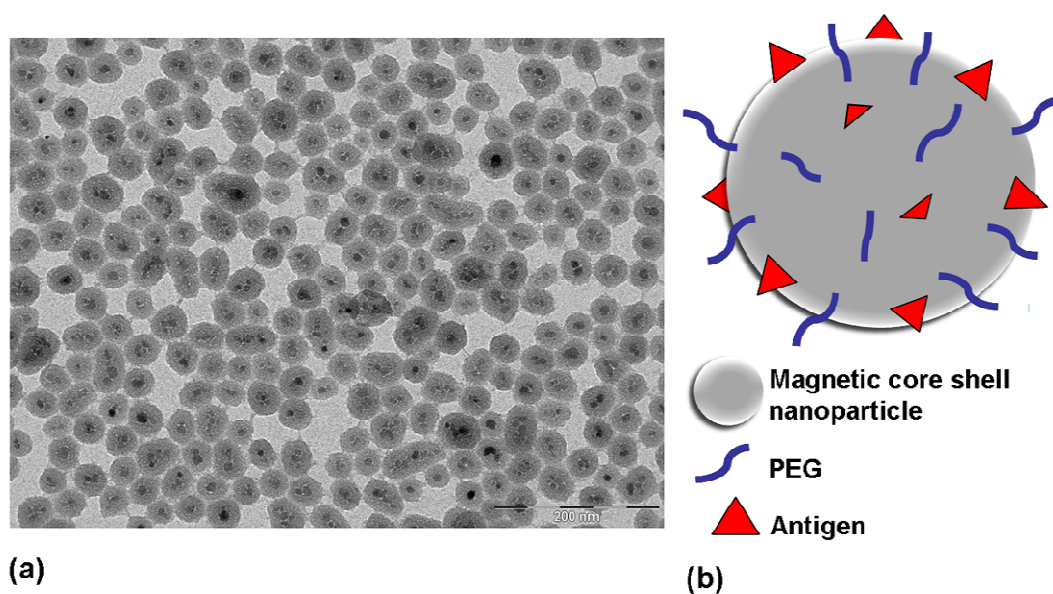
$$\frac{\chi}{\chi^{\text{eq}}} = 1 - \exp\left(-\frac{2k_{\text{app}} t}{Da(t)} \left(1 - \frac{\ln(1 + Da(t))}{Da(t)}\right)\right) \quad (8d)$$

In summary, the impact of solution exhaustion and species diffusion on the kinetics of B capture on an immunosupport is dominated mainly by 2 dimensionless parameters,  $K_A n_A^0 / V = K_A \Gamma^0 S / V$  and  $Da = k_{\text{on}} \Gamma^0 \frac{\delta}{D}$  or  $k_{\text{on}} \Gamma^0 \sqrt{\frac{2t}{D}}$  respectively for stagnant or expanding diffusion layer. The first parameter characterizes the impact of the surface to volume ratio on the immunoassay kinetics while the second characterizes the competition between the association and diffusion characteristic times. All the predicted evolution equations (8a-d) should be sufficient to characterize the immunoassay performed in this work. They all corroborate that the consumption of B (increase with S/V ratio) accelerates the association process while the diffusion tends to slow it down. The impact of diffusion on the overall process is kinetically limiting as long as it is slower than the desorption rate and such diffusion limitation are mainly observed at long times, the short time behavior being limited by the adsorption/desorption reaction kinetics.

### Immunosupport description and medium influence on reaction specificity

In order to evaluate the Ag-Ab reaction kinetics at macro, micro and nanoscale, three different immunological supports have been used: the conventional microtiter plate, magnetic micrometric particles and MCSNP. The different supports used and their different characteristics are summarized in Table 1. The conventional 96 wells microtiter plate was made of polystyrene, the diameter and the height of the well were 6 and 10 mm respectively. The sample volume added in the well was  $V = 100 \mu\text{L}$  which correspond to a liquid height of about 3 mm and a specific surface of immobilized Ag S  $\sim 0.9 \text{ cm}^2$ . The micrometric iron particles were 4  $\mu\text{m}$  diameter and offer

paramagnetic properties due to iron oxide core. The polystyrene shell is functionalized with amino group to allow biomolecules covalent grafting. The MCSNP have been synthesized as described in the experimental section. Maghemite nanoparticles were encapsulated in a silica shell and the surface was functionalized with PEG and amino groups. The surface chemistry was easily tunable, in that way two types of MCSNP have been designed by varying the PEOS/APTS ratio during the silica shell functionalization. The MCSNP physical diameter was evaluated at  $34 \pm 6$  nm by transmission electron microscopy (Fig.1) and their hydrodynamic diameter measured by dynamic light scattering was around  $40 \pm 2.5$  nm. The amino groups are dedicated to biomolecules grafting and PEG chains to prevent non-specific interactions [33]. Moreover the PEG and amino groups also contribute to colloidal stability. These objects are stable for months without sedimenting. The MCSNP have been previously characterized by CE and ninhydrin colorimetric test [36].



**Fig. 1** Transmission electron microscopy image (a) of MCSNP made of maghemite nanoparticles (dark) encapsulated in silica shell (grey). Scheme of the MCSNP functionalized with  $\alpha$ -lac Ag (b)

Each support was then grafted with an Ag ( $\alpha$ -lac) used as capture molecule to specifically react with the target Ab. The Ag grafting was performed by physisorption on the microtiter plate and using covalent binding with micro and nanoparticles. The surface of each support was saturated



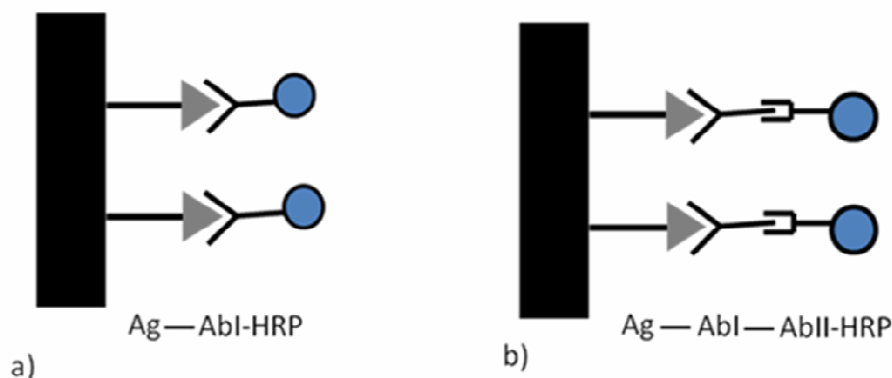
with the Ag. The reduction of the support size to nanoscale allows to increase the surface to volume ratio. In the conditions of the immunoassay investigated here the surface to volume ratio S/V was  $9 \text{ cm}^{-1}$  for microtiter plate and was modulated, by change of the particles concentrations from  $0.36 - 7.5$  and  $30 - 1.3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$  for micrometric particles and MCSNP respectively. The amount of Ag immobilized on the different immunosupports has been estimated using a procedure previously described [38]. The Ag density was 0.01, 0.005, 0.036 and  $4 \text{ Ag nm}^{-2}$  on the MCSNP1, MCSNP2, microtiter plate wells and microparticles respectively. The maximum density of Ag for a full monolayer surface coverage is about  $0.06-0.09 \text{ Ag nm}^{-2}$ , [40] which compares well with the microtiter plate density,  $0.036 \text{ Ag nm}^{-2}$ . The density on microparticles,  $4 \text{ Ag nm}^{-2}$ , is very high, more than 50 times the calculated and observed value for full monolayer surface coverage  $0.06-0.09 \text{ Ag nm}^{-2}$ , and underlines that Ag are rather structured in multilayers on this support. However, for quantitative kinetic analysis, the Ag density accessible for the adsorption process will be taken as  $0.06 \text{ Ag nm}^{-2}$ .

We have then studied the specificity, the kinetic parameters and the capture capacity of the supports following the procedure depicted in Fig. 2a. Direct binding of labeled target AbI (AbI-HRP) was used to directly quantify the captured target, while the whole immunoassay was performed as shown in Fig. 2b using the MCSNP.

**Table 1 Characteristics of the different immunosupports and of their immunological kinetic response. For micro and nanoparticles the extreme values of particles concentration range are given**

	Microplate	Microparticles		MCSNP	
S (cm <sup>2</sup> )	0.9	0.16	3.4	13.5	6 10 <sup>3</sup>
particle/cm <sup>3</sup>	-	7.2×10 <sup>8</sup>	15×10 <sup>9</sup>	6.6×10 <sup>11</sup>	3×10 <sup>14</sup>
S/V (cm <sup>-1</sup> )	9	0.36	7.5	30	7.5×10 <sup>4</sup>
Γ <sup>0</sup> (nmol cm <sup>-2</sup> )	6×10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>		6×10 <sup>-4</sup>	
K <sub>A</sub> (M <sup>-1</sup> )	1.7×10 <sup>7</sup> (1.1×10 <sup>7</sup> *)	1.6×10 <sup>8</sup>		2×10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>
k <sub>app</sub> (s <sup>-1</sup> )	3×10 <sup>-5</sup>	1.6×10 <sup>-4</sup>	2.3×10 <sup>-3</sup>	2.5×10 <sup>-3</sup>	4.5×10 <sup>-3</sup>
K <sub>A</sub> Γ <sup>0</sup> S/V	0.92	0.54	15	3.6	8.0
k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	3×10 <sup>-5</sup> (8×10 <sup>-4</sup> *)	1×10 <sup>-4</sup>		5.5×10 <sup>-4</sup>	5×10 <sup>-4</sup>
k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	5×10 <sup>2</sup> (9×10 <sup>3</sup> *)	1.6×10 <sup>4</sup>		1.1×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>2</sup>
δ (cm)	< 0.3	2×10 <sup>-5</sup>		2×10 <sup>-7</sup>	
Da	< 1.5	6×10 <sup>-2</sup>		9×10 <sup>-4</sup>	4×10 <sup>-6</sup>

\*Data obtained by SPR experiments (α-lac immobilized on the prism surface)



**Fig. 2 Immunoreaction between immobilized Ag and labeled AbI (AbI-HRP) (a).** After the immunoreaction and washing step, HRP substrate was added for the detection step. **Procedure for the whole immunoassay (b),** first AbI was captured with the immobilized Ag and after washing step a labeled Ab (AbII-HRP) was reacted with target AbI. Finally HRP substrate (OPD) was added for detection step.

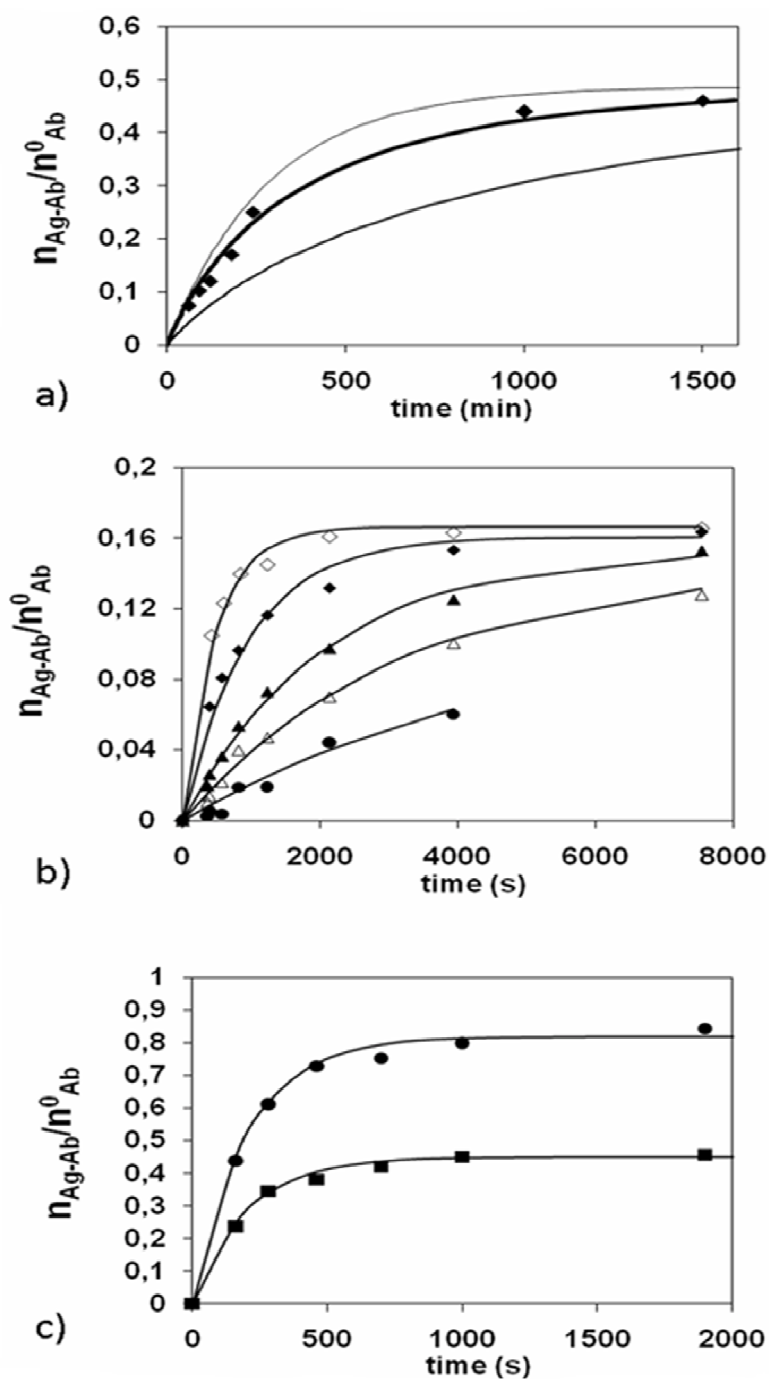
The influence of immunological binding buffer in terms of ionic strength and ions/counter ions nature on the reaction specificity has been evaluated (see Fig. S1 in Electronic supplementary materials) using MCSNP as they offer the highest specific interface (S/V) and therefore, as explained in the preceding section and as will be shown later, the fastest completion of the immunoreaction. Direct binding of AbI-HRP used as specific Ab was compared with HRP-conjugated goat anti rabbit IgG used as non-specific Ab. The influence of ionic strength on specific and non-specific signal was evaluated with a PBS at pH 7.5 containing Tween 20 (0.1% v/v). The results obtained showed that as expected the capture of specific Ab was favored at low ionic strength (10 mM) where 100 % of the specific Ab were captured after 2 h incubation (Fig. S1a). At low ionic strength a high concentration of non-specific Ab (1000 ng/mL) leads to significant background signal due to non-specific adsorption on the nanoparticles surface despite the presence of surfactant. At 150 mM ionic strength, the capture of specific Ab decreased by half whereas the non-specific signal was dramatically reduced even at 1000 ng/mL. The buffer counter ions might interact with charged moieties of MCSNP and generate competitive interactions with non-specific Ab for electrostatic interactions, thus reducing the non-specific adsorption of biomolecules. At high ionic strength, the specific to non-specific signal ratio was undetermined since the value of non-specific signal was undetectable for Ab concentration lower than 1000 ng/mL. Consequently, the influence of counter ions nature was investigated. For that purpose, specific and non-specific adsorptions were evaluated in phosphate buffer (PB) and PBS at high ionic strength (150 mM) (see Fig. S1b in Electronic supplementary materials). These experiments showed that PB prevented less

efficiently non-specific adsorption than PBS. NaCl is well known for its desorption properties in immunochromatography, its presence in PBS should thus explain this difference. Finally these experiments have shown that despite the presence of PEG moieties on the nanoparticles, non specific adsorption can occur and that to achieve the highest specific signal a buffer of high ionic strength and containing NaCl salt is required.

### Immunological reaction kinetics

The kinetics studies have been performed using PBS with high ionic strength because (i) it prevents more efficiently non-specific interaction and (ii), as it will be shown later, it reduces Ab capture efficiency, in that way it was easier to determine the influence of studied factors on kinetic and thermodynamic parameters.

Fig. 3 presents typical examples of AbI-HRP capture on the three different immunosupports. Clearly, as the dimension of the immunosupport is decreased from macro to micro and nanometer dimension the characteristic time of AbI-HRP capture is decreased. The different immunocapture kinetic experiments have been fitted with the different model proposed in section 1. On microtiter plate support, possible limitation by the Ab diffusion may be observed especially as long reaction times are needed to reach the immunocapture equilibrium ( $t > 4h$ ). The value of the Ab diffusion coefficient, obtained independently from capillary electrophoresis experiments was estimated to  $D = 8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . The immunocapture on microtiter plate was then fitted by (8d). From the knowledge of  $D$  and of the equilibrium maximum capture ( $\chi^{\text{eq}}$  given by 10a) the best fit of the immunoassay kinetics by (8d) yields the different parameters of the capture reaction (listed in Table 1).



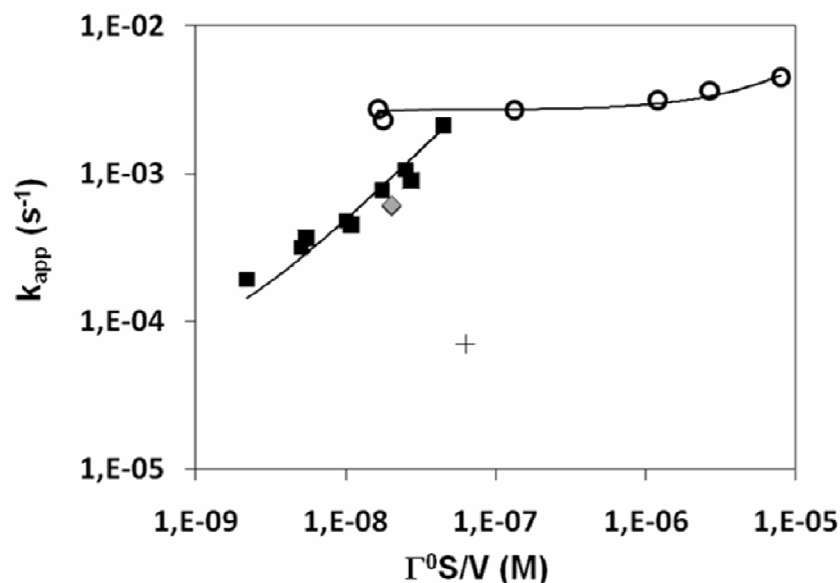
**Fig. 3** Examples of immunocapture with (a) microtiter plate:  $[AbI-HRP]=10\text{ ng/mL}$  in  $150\text{ mM}$  PBS-Tween (0.1% v/v), symbols: experiment, theoretical lines: without (upper) and with (lower) diffusion limitation; (b) microparticles:  $[Ab]=10\text{ ng/mL}$  in  $150\text{ mM}$  PBS-Tween (0.1% v/v) from top to bottom  $150, 83, 33, 16, 7.2 \times 10^8$  microparticles/mL; symbols: experiments, line: theoretical fits; (c) MCSNP:  $[Ab]=10\text{ ng/mL}$ , influence of the PBS ionic strength:  $50\text{ mM}$  (square) and  $150\text{ mM}$  (circle) with theoretical lines. MCSNP concentration was  $1 \times 10^{14}$  MCSNP/ mL

The microparticles and MCSNP supports were used in stirred or unstirred solutions. The stirring does not affect the MCSNP immunocapture kinetics (data not shown) indicating that the transport mainly proceeds in a layer smaller than the convective layer generated by the stirring. Indeed, spherical sources or sinks are known to develop diffusion gradient in layers of the order of the source dimension which are difficult to attain by convective means. It is particularly illustrated in electrochemistry as the exceptional qualities of microelectrodes. Moreover the time required to establish nanometric to micrometric diffusion layer,  $\delta$ , is  $\tau_{\text{diff}} = \delta^2/D < 0.1$  s confirming that under the characteristic time explored during the immunocapture, the nano and microparticles behaves under steady-state mass-transfer regime. In the case of the microparticles support the immunoreaction was faster in stirred than on unstirred solution. Even if convective layers smaller than  $10 \mu\text{m}$  is unlikely under our experimental conditions, the stirring is essential with microparticles in order to prevent the microparticles sedimentation which would modify Ag accessibility. For both micro and nanometer size particles the immunocapture kinetics is then not limited by Ab diffusion as attested by the  $Da$  values in Table 1 and these experiments were fitted by (8b). As shown in Fig. 3b, the fits are good, however, owing to the minimum time required for the immunosupport cleaning procedure (5 min) it is difficult within the proposed experimental procedure to inspect fast capture processes within high uncertainties (up to 100%). By changing the microparticles content in the solution, the S/V of the immunosupport was modulated. The kinetic analyses of these different immunoreactions are reported in Fig. 3b, it can be seen that when the amount of microbeads (and therefore S/V) increases, the Ab capture rate increases. The different Ab capture kinetics were fitted by (8a) which allowed the estimation of the apparent first order reaction rate  $k_{\text{app}}$  of the overall process.

Figure 3c presents typical capture kinetics of Ab by colloidal MCSNP: the capture efficiency reaches a plateau within very short reaction time (10 min) compared to the larger supports. The capture is also satisfactorily fitted by a single exponential variation (8a). However, when the capture is prolonged over 2h, the capture efficiency tends to increase slightly and slowly (see Supporting information Fig. S2). This long time behavior could be fitted by a second capture process associated with a characteristic rate  $k_{\text{app, long time}}$  about 25 times slower than the first fast capture. Such bi-exponential fitting of Ag-Ab interaction has already been reported and may have different interpretations [39,41]. The binding of two Ab on a single Ag site is unlikely here owing to the large excess of MCSNP versus Ab. Rather, one could invoke the heterogeneity of Ab and/or MCSNP populations presenting different binding characteristics. As the slow long time behavior is

not significant, the discussion on the kinetic analysis was just made on the first and fastest capture process. Fig. 3c presents more particularly the effect of the ionic strength of the reaction buffer on the immunoreactions kinetics using MCSNP. If the increase of the ionic strength from 50 mM to 150 mM is associated with a decrease in the plateau capture efficiency of the Ab target, the capture proceeds for both buffer at the same overall rate  $k_{app}$ . The target capture efficiency level off at about 83% for an ionic strength of 50 mM whereas at higher ionic strength (150 mM) the plateau was observed at 45%. This decrease by a factor of 5 (according 10a) of the Ag-Ab association ( $K_A$ ) when the ionic strength is increased shows that despite Ag-Ab interaction is mainly governed by hydrophobic interactions, it also depends on electrostatic interactions: when the ionic strength is increased, the competition between the binding of Ag or buffer ions to Ab increases leading to a decrease in Ab capture.

Fig. 4 presents the evolution of  $k_{app}$  versus the immobilized Ag concentration  $[Ag]^0 = \Gamma^0 S/V$  which represents the S/V and the immunosupport intrinsic maximum capacity. For the microparticles support,  $k_{app}$  increases linearly with  $\Gamma^0 S/V$  as expected from the model of solution exhaustion (8a:  $k_{app} = k_{off} (1 + K_A \Gamma^0 S/V)$ ). The  $K_A$  value extracted from such variation ( $K_A = 1.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) agrees with that obtained from the equilibrium Ag-Ab coverage (eq 4a). It indicates that Ag bound on the microparticles support are more affine (higher  $K_A$  value) than when Ag are immobilized on the microtiter plate one but also that both the adsorption and the desorption steps are faster with the microparticles (respectively 30 and 3 times faster). The variation of Ab concentration (from 0.2 to 2 ng/mL) reacting with a fixed immobilized Ag has no influence on  $k_{app}$ , this might be due to high excess of Ag compared to Ab (Ag/Ab ratio was about  $10^5$ ).



**Fig.4 Evolution of the experimental apparent first-order immunocapture rate constant,  $k_{app}$ , determined from the fitting of experimental data for (+) microtiter plate, square: microparticles and circles: MCSNP immunosupports. Lines correspond to fit by a linear regression for the microparticles and MCSNP supports. The grey diamonds represent different concentration of Ab (from 0.2 to 2 ng/mL), the values are superimposed**

With nanometer size immunosupport the increase of MCSNP content results in a very moderate increase of apparent capture kinetics as  $k_{app}$  increases by two fold when the MCSNP content is increased by 3 orders of magnitude. From the predicted variation of  $k_{app}$  with  $\Gamma^0 S/V$  this would correspond, at high  $\Gamma^0 S/V$ , to  $K_A$  values of the order of  $10^6 M^{-1}$ . This value actually fits the  $K_A$  value estimated from the equilibrium capture at high MCSNP concentration. However, at lower MCSNP content the Ag-Ab adduct formation is characterized by a much larger association constant  $K_A = 2 \times 10^8 M^{-1}$  closer to the value obtained on the microparticles support within similar  $[Ag]^0$  concentration. The MCSNP support in this concentration range is however more favorable than the microparticles as it corresponds to Ab capture with a 5 times faster association and dissociation rate constants. The MCSNP in the same surface capacity range is also more similarly affine (higher to similar value of  $K_A$ ) than the microtiter plate support but with >10 times faster dissociation rate. The increase of immunocapture kinetics and affinity when going from a planar surface to nanoparticles is consistent with different Surface Plasmon Resonance (SPR) investigations of the protein-protein or protein-molecule binding reaction with nanoparticles-based platform [18, 19].



When the MCSNP concentration is increased the overall capture kinetic,  $k_{app}$ , is increased while the capture efficiency levels off and never exceeds 50-60% of the Ab available in solution after 2h incubation. An efficiency very similar to that observed on the microtiter plate support after 20 h incubation. The variation of capture kinetics and capture efficiencies with the MCSNP content or the change in S/V ratio indicate that both  $K_A$  and the association rate  $k_{on}$  decreases as the MCSNP content and the S/V increases. Meanwhile the dissociation rate  $k_{off}$ , if measurable, does not significantly change. Like for the microparticle support, with nanoparticles the overall capture kinetic,  $k_{app}$ , is controlled by the association kinetic rate and the thermodynamics of the capture reaction, but both  $K_A$  and  $k_{on}$  decrease proportionally with the nanoparticle content. Even if for the highest MCSNP concentration both  $K_A$  and  $k_{on}$  tends towards values reminiscent of those observed on the microtiter plate support, the overall capture kinetics is faster with the nanosupport because of the much higher Ag content or S/V ratio.

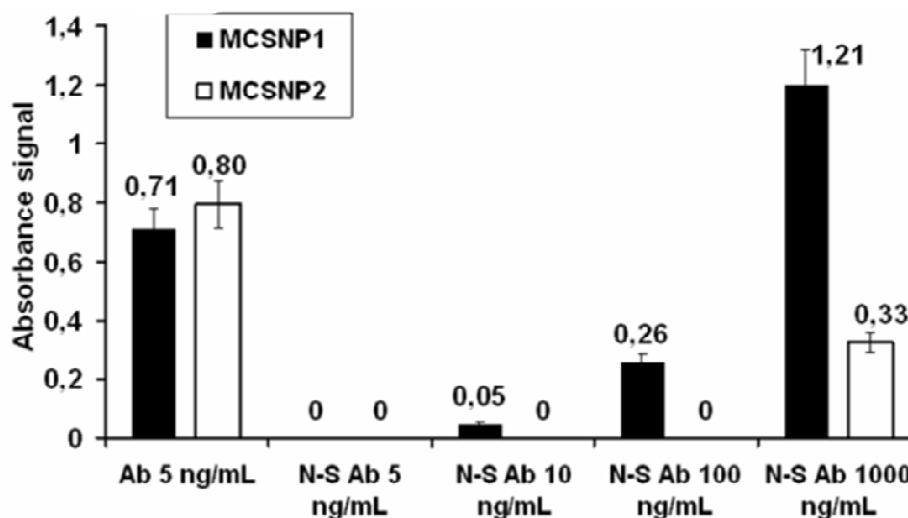
The increase of nanoparticle content (here the highest MCSNP content corresponds to a 2% fraction volume) is expected to strongly affect the physico-chemical behavior of the colloidal solution. At high volume fraction, ferrofluids are prone to glass transition accompanied with the slowing down of dynamical processes [42]. For example, for nanoparticles similar to those used in this work, it was shown that mass-transfer was strongly impeded for moderate volume fraction ( $> 0.5\%$ ) [43]. Reactivity changes are also expected: the repulsive colloidal interactions responsible for the stability of the suspension also decreases the frequency of encounters between the target Ab and the nanoparticle and lead to the overall capture kinetics,  $k_{app}$ , decrease. This latter argument is actually in agreement with the manifestation of the effect of MCSNP content mainly on the association rate constant,  $k_{on}$ , which is proportional to the frequency encounters.

At low nanoparticle concentration, the immunocapture, even if accelerated compared to the other immunosupports, is slow compared to homogeneous Ab-Ag capture. Indeed, with a bimolecular rate of  $k_{hom} \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the homogeneous phase Ag-Ab capture (a typical minimum value for protein binding with maximum value of the diffusion limit  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [44,45], an apparent capture rate  $k_{app} \sim k_{hom}[\text{Ag}]^0$  ranging from  $10^{-2}$  to  $10 \text{ s}^{-1}$  was expected in the Ag concentration range used in this work. These values are at least ten times faster than those observed herein and validate the slowness of heterogeneous immunoreactions versus homogeneous ones. The rate observed with MCSNP is actually comparable to rates of capture, under magnetic field activation, of a target biomolecule by a 200 nm diameter receptor-grafted MCSNP [46, 47]. At such nanoparticle immunosupports, the immunocapture was also much slower than in homogeneous solution and the

slowing-down has been attributed to limitation by the rotational diffusion of the target around the nanoparticle until it has found its receptor. To increase the capture one should use longer and more flexible linker between the receptor and the nanoparticle. For short linker or when the receptor is close to the nanoparticle shell, the role of the surface prevails and slower kinetics ( $k_{app} \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) are observed, in agreement with those observed here with 5 times smaller MCSNP.

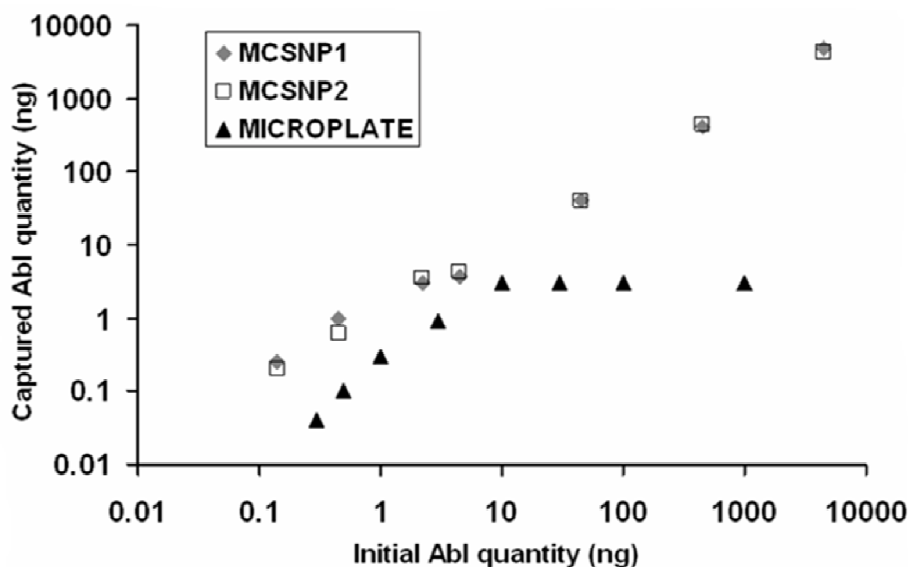
#### Influence of the MCSNP surface chemistry on the reaction specificity and target capture capacity

The reaction kinetics study showed that the nanoplateform allows, even in highly concentrated colloidal solution, faster capture of target AbI than macro and microsupport justifying the choice of MCSNP as immunosupport for a fast immunoassay. As mentioned earlier, these MCSNP offer a tunable surface chemistry, in that way the effect of MCSNP surface functionalization on immunoreaction specificity was evaluated. Two types of MCSNP have been synthesized with PEOS/APTS ratio of 1:1 and 3:1 for MCSNP1 and 2 respectively. The number of grafted Ag was 35 per MCSNP1 ( $0.01 \text{ Ag/nm}^2$ ) and 18 per MCSNP2 ( $0.005 \text{ Ag/nm}^2$ ). The reactions were performed in PBS buffer and using specific and non-specific Ab as previously described. After 2 h incubation, we observed that for both types of MCSNP and for Ab concentration at 5 ng/mL, the signal obtained with non-specific Ab was non-significant compared with the signal obtained with the specific one thus confirming the specificity of the interaction (Fig. 5). The Ab capture rate was of the same order of magnitude for both types of MCSNP due to the very high value of Ag/Ab molar ratio, which was around  $1.55 \times 10^5$  with MCSNP1-Ag and  $8 \times 10^4$  with MCSNP2-Ag. However the Ab capture recovery was slightly higher using MCSNP2-Ag. This result could be explained by a lower Ag density that should limit steric hindrance and thus favor immune recognition. When increasing non-specific Ab to high concentration, a non-specific signal was observed for the highest concentration values but the background signal was 4-fold lower using MCSNP2-Ag. This decrease of non-specific adsorption is certainly due to (i) a higher quantity of PEG chains on MCSNP2 surface that improves steric repulsion and limits non-specific interactions and (ii) a lower amount of residual (uncapped) amino groups that reduces non-specific electrostatic interaction.



**Fig. 5 Influence of PEOS/APTS ratio on specific and non-specific Ab-HRP interaction with  $\alpha$ -lac Ag grafted on MCSNP1 and 2.** The immunoreactions were performed in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) at pH 7.5 with 2 h incubation. The detection was done with OPD (0.25 mg/mL) for 30 min. The error bars reflect RSD based on 3 repetitions. Ab: specific Ab, N-S Ab: non-specific Ab, MCSNP1 = 35 Ag MCSNP<sup>-1</sup>, MCSNP2 = 18 Ag MCSNP<sup>-1</sup>. MCSNP concentration was  $1 \times 10^{14}$  MCSNP/mL

Furthermore, we evaluated the AbI-HRP capture capacity performed in the direct binding conditions as previously mentioned for MCSNP1 and 2 and compared it with a gold standard i.e. a microtiter plate. Fig. 6 shows the amount of captured AbI-HRP versus its initial amount. The microtiter plate well surface was quickly saturated, the maximal quantity of captured AbI-HRP was around 3 ng per well for a 2 h capture even though, as shown in Figure 3a the system is far from steady-state at this time. When using the MCSNP as immunosupport at times such that steady-state is reached, AbI-HRP capture was linear over 5 orders of magnitude. Even for high Ab concentration (10,000 ng/mL), the MCSNP-Ag surface was not saturated. These results can be explained by the S/V that is approximately  $10^4$ -fold higher using MCSNP than the one obtained using microtiter plate well as mentioned earlier. For the following studies, MCSNP2-Ag was preferred as it offers higher specificity than MCSNP1-Ag while keeping the same capture capacity.



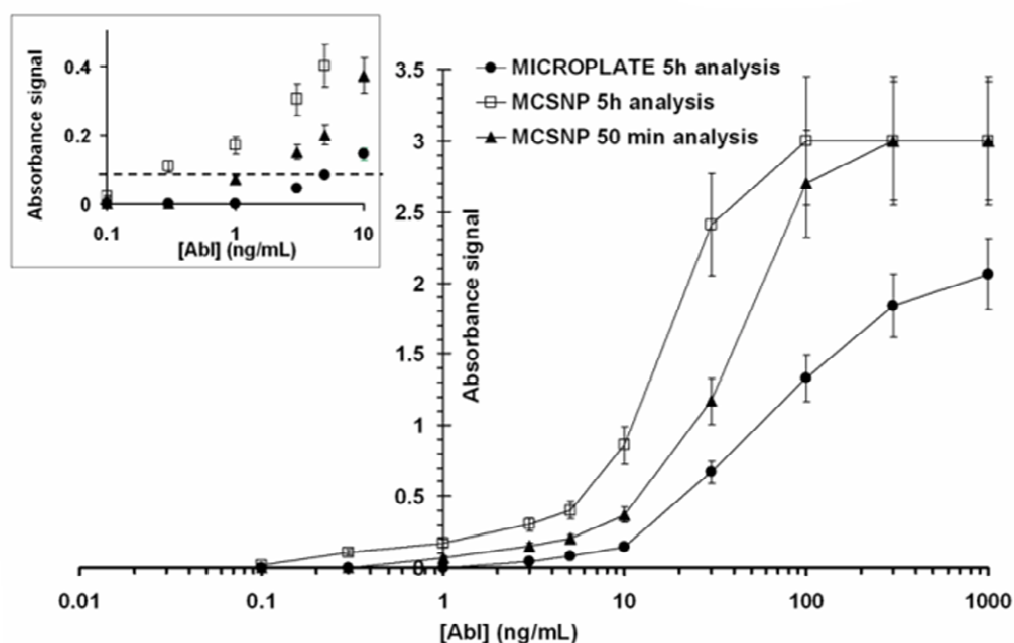
**Fig. 6 Capture capacity of AbI-HRP for the MCSNP and microtiter plate system.** The immunoreactions were performed in 10 mM PBS-Tween (0.1% v/v) at pH 7.5 for 2h incubation, the values for both types of MCSNP are superimposed. The error bars are not visible because of the logarithmic scale (RSD = 5% and 3% for MCSNP and microplate, respectively, 3 repetitions). MCSNP1 = 35 Ag MCSNP<sup>-1</sup>, MCSNP2 = 18 Ag MCSNP<sup>-1</sup>. MCSNP concentration was  $1 \times 10^{14}$  MCSNP/mL

Development of an immunoassay: performances of MCSNP *versus* gold standard microtiter plate

The whole immunoassay was performed following the procedure depicted in Figure 2b. The colloidal and microtiter plate immunoassays were performed in three incubation steps. In a first step, AbI was allowed to react with immobilized Ag. After washing, AbII-HRP was added and a third step corresponds to the addition of HRP substrate. The colorimetric signal obtained from the HRP enzymatic reaction reflected AbII-HRP quantity and consequently AbI quantity. The immunoassay using MCSNP was performed in 2 mL Eppendorf tube. To evaluate the performance of the MCSNP-based immunoassay, two parameters have been estimated: the time required to perform the assay and the assay sensitivity. MCSNP-based immunoassay was validated by comparing it with conventional microtiter plate.

The sensitivity of the MCSNP-based immunoassay and the domain of linearity of the signal were evaluated with the calibration curve of target AbI (ranging from 0.1 to 1,000 ng/mL) obtained after performing the whole immunoassay as shown in Fig. 7. The limit of detection (LOD) was chosen to be 3 standard deviations above the background (in absence of AbI). The LOD was estimated around 5 ng/mL in microtiter plate well and 0.3 ng/mL using MCSNP method after 5h total analysis time in

both systems. This analysis time can be shortened to 50 min using the MCSNP and the sensitivity, evaluated at 3 ng mL, was still higher than the microtiter plate one. These results indicated that assay time and sensitivity parameters have to be well balanced according to the needs: long analysis time (5h) allows to reach sensitivity 10 times higher than the shorter one (50 min) by using the MCSNP. The linearity was obtained in a concentration range of 0.3-30, 3-100 and 10-100 ng/mL for MCSNP 5h analysis, MCSNP 50 min analysis and microtiter plate 5h analysis respectively. The main limitation in the analytical procedure using MCSNP is related to the washing step, performed by centrifugation or MACS column, which represents 60% of the total analysis time. Indeed the sum of all incubation times was only 20 min as detailed in Fig. 7 caption. The error bars indicate the relative standard deviation (RSD, n = 3), which was 14% for the MCSNP2 system and 11% for ELISA in microplate. These values can be explained by the enzymatic detection which is drastically dependent on temperature variation and on substrate incubation time, moreover the RSD was determined on interday repetitions.

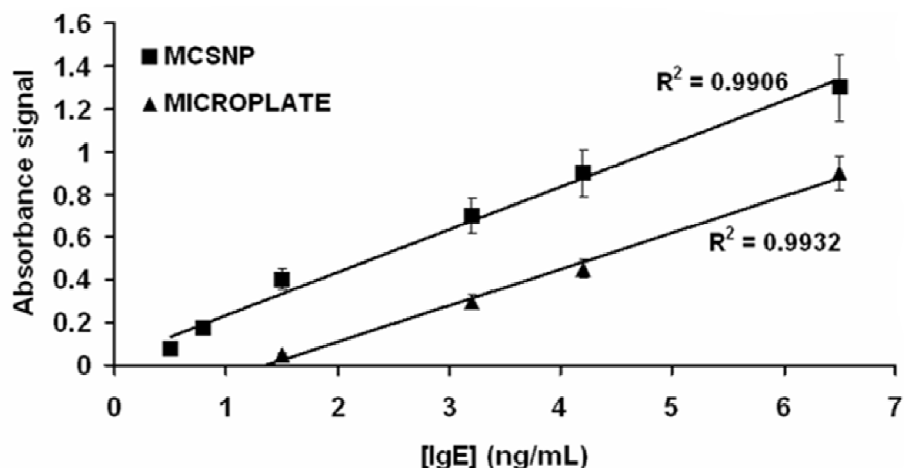


**Fig. 7 Calibration curve of AbI in MCSNP and microtiter plate-based immunoassay. The inset is a focus on the AbI concentration range from 0.1 to 10 ng/mL. The dot line represents the LOD. The immunoreactions were performed in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) at pH 7.5, the AbI concentration ranged from 0.1 to 1000 ng/mL and AbII-HRP concentration was set at 2000 ng/mL. The detection was done with OPD at 0.25 mg/mL. Error bars reflect RSD based on 3 interday repetitions. The incubation time of AbI was 2h for □ and ● and 5 min for ▲. Incubation time for AbII was 1h for □ and ● and 5 min for ▲. Detection time was 30 min for □ and ● and 10 min for ▲**

### Allergy Diagnosis with Milk Allergic Patient's Sera Sample

The compatibility of the MCSNP-based immunoassay towards biological sample like serum was tested by doping Goat sera with target AbI. Four different sera, diluted from 20 to 1000 times in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) at pH 7.5, were doped with a fixed AbI-HRP quantity (5 ng) and mixed with MCSNP-Ag. After 2h incubation the mean AbI-HRP recovery was evaluated at 67 % with an RSD of 4.7% and the MCSNP was still colloidal. This value ( AbI-HRP capture recovery of 69% ) was very close to the one obtained for the same concentration of Ab prepared in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v) at pH 7.5 (see Fig. S2 in Electronic supplementary materials). These results indicated the absence of significant matrix effect on target capture efficiency and MCSNP stability.

Finally, the MCSNP-based immunoassay was validated by the analysis of anti  $\alpha$ -lac IgE in sera from cow's milk allergic patient in a view of allergy diagnosis. Besides the clinical examination (*in vivo*), allergy diagnosis is essentially performed using *in vitro* test based on IgE determination by ELISA in microtiter plate. To validate the potential of this new immunoassay,  $\alpha$ -lac specific IgE of sera from milk allergic patients were quantified in parallel by MCSNP and microtiter plate-based immunoassay. The IgE quantitation was performed using calibration curves (Fig. 8) elaborated with a reference  $\alpha$ -lac allergic patient serum whose  $\alpha$ -lac specific IgE concentration was known. The reference serum was diluted from 20 to 1000 times for IgE calibration which is the standard dilution range of sera observed for allergy diagnosis. In the concentration range studied, a linear response has been achieved with a correlation coefficient of 0.99 for both MCSNP and microtiter plate supports. The LOD for IgE determination using nanoparticles was estimated at 0.5 ng/mL which is 5 times lower than the one estimated with microtiter plate. This LOD meets the sensitivity required for allergy diagnosis. The comparison of IgE determination for two unknown sera indicates an excellent agreement of the results obtained with MCSNP and microtiter plate techniques (Table 2) as illustrated by the estimated coefficient of variation of 5.4 and 0.9 % for serum 1 and 2 respectively. These results demonstrated that our MCSNP-based immunoassay is suitable for allergy diagnosis since it was validated by comparison with conventional microtiter plate ELISA.



**Fig. 8** Calibration curve of  $\alpha$ -lac specific IgE from reference serum determined with MCSNP and microtiter plate. The immunoreactions were performed with sera diluted in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v), the  $\alpha$ -lac specific IgE concentration ranged from 0.1 to 6.5 ng/mL (2 h incubation) and anti-IgE-AP concentration was set at 1000 ng/mL (1 h incubation). The detection was done with pNPP (1 mg/mL) for 1 h. Error bars reflect RSD based on 3 intraday repetitions

**Table 2.** Comparison of  $\alpha$ -Lac specific IgE determination on patient's sera using MCSNP or microtiter plate support

Sample	Serum dilution	IgE determined by microtiter plate (ng/mL)	IgE determined by MCSNP (ng/mL)	Variation coefficient between microtiter plate and MCSNP results (%)
Serum 1	1/30	123	114	5.4
Serum 2	1/30	143	141	0.9

## Conclusion

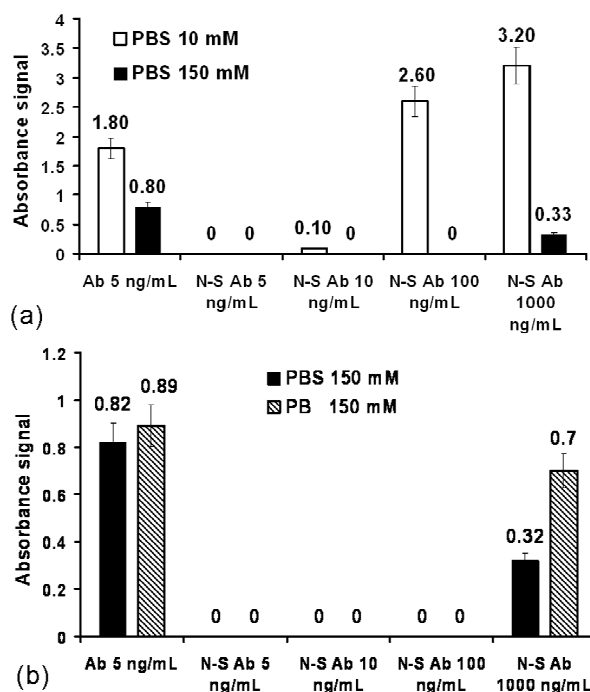
In this present study, a colloidal MCSNP-based immunoassay dedicated to allergy diagnosis was developed. The advantage of increasing the surface to volume ratio in immunosupports was first highlighted by comparing immune reaction kinetics at macro, micro and nanoscale using conventional microtiter plates, 4  $\mu\text{m}$  diameter microparticles and colloidal solution of MCSNP. The model used to investigate the Ag-Ab reaction kinetics with these three different immunosupports was described. This approach allowed the determination of the apparent first-order rate constant characteristic of the capture kinetics,  $k_{\text{app}}$ . The decrease of the immunosupport dimension led to accelerated capture kinetics,  $k_{\text{app}}$ . If microparticles show an increase of the apparent kinetic rate constant with the microparticles content, the increase of MCSNP content by 3 orders of magnitude only yields a two-fold increase of  $k_{\text{app}}$ . The variations observed at the MCSNP immunosupport indicated a lowering of both the affinity  $K_A$ , and the association rate constant  $k_{\text{on}}$ , with an increase of MCSNP fraction volume which creates steric hindrance. However the highest surface to volume ratio provided by the nanoparticles support yields always the fastest kinetics of capture even though intrinsically the capture proceeds with  $K_A$  and  $k_{\text{on}}$  values which at high MCSNP content resemble those observed on microtiter plate. We have then underlined the influence of relevant parameters such as MCSNP surface functionalization, Ag density, ionic strength and buffer nature on Ab capture efficiency and specificity. The magnetic properties of this nanoplatform allow easy separation of complex and free forms under magnetic field. The MCSNP colloidal behavior and Brownian motion ensure faster immunoreactions and the enhanced surface to volume ratio allows a high target Ab capture recovery resulting in a LOD of one order of magnitude lower than for conventional microtiter plate and a shortened assay time. The compatibility and the validation of the developed system to allergy diagnosis were shown by quantifying  $\alpha$ -lac specific IgE from patient sera. The concept of this new immunoassay could be extended to environmental or food applications. This work is a significant step toward the development of a miniaturized immunoassay dedicated to immunodiagnosis incorporating MCSNP.

## Acknowledgements

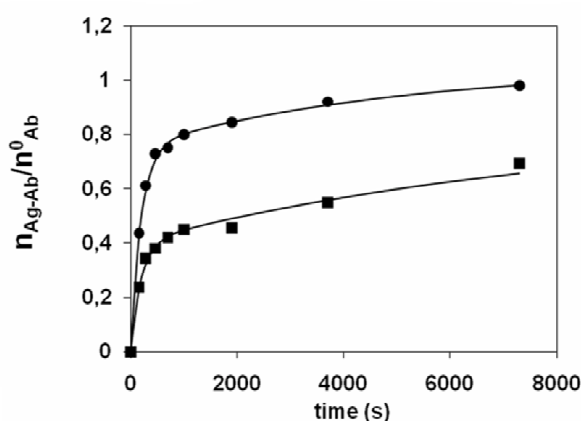
This work was supported by the French research agency ANR SOLUDIAG ANR-07-BLAN-02660.



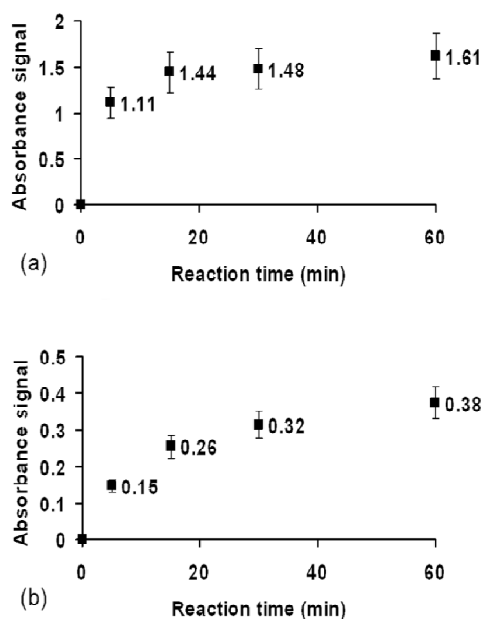
### Supporting information



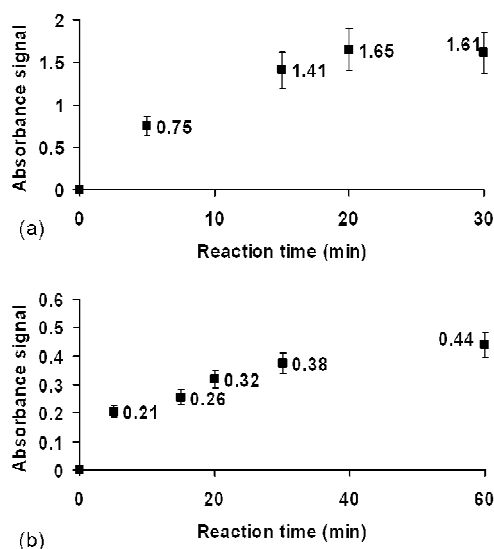
**Fig. S1 Influence of ionic strength on specific and non-specific Ab-HRP interactions with  $\alpha$ -lac Ag grafted on MCSNP.** The immunoreactions were performed in 10 or 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v), with 2 h incubation. The detection was done with OPD (0.25 mg/mL) for 30 min (a). Influence of counter ion nature on specific and non-specific Ab-HRP interactions with  $\alpha$ -lac Ag grafted on MCSNP2. The immunoreactions were performed in 150 mM PB or PBS following the same conditions as (a). The error bars reflect RSD based on 3 repetitions. Ab: specific Ab, N-S Ab: non-specific Ab (b).



**Fig. S2 Kinetic capture of target Ab for long time incubation (until 2h incubation) using MCSNP2 at  $1 \times 10^{14}$  MCSNP/ mL and  $[Ab]=10$  ng/mL.** Influence of the PBS ionic strength on Ab capture recovery: 50 mM (square) and 150 mM (circle) with theoretical lines.



**Fig. S3. Time course for AbI/AbII-HRP interaction using the MCSNP (a) and microplate (b) supports.** The immunoreactions were performed in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v), AbI concentration was set at  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  (2 h) and AbII-HRP was fixed at  $2000 \text{ ng mL}^{-1}$ . The detection was done with OPD ( $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for 30 min. The error bars reflect RSD from 3 measurements.



**Fig. S4. Time course for AbII-HRP catalytic reaction (detection step) with the MCSNP (a) and microplate (b) supports.** The immunoreactions were performed in 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v), the AbI was set at  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  (2 h incubation) and AbII-HRP at  $2000 \text{ ng mL}^{-1}$  (1 h). The detection was done with OPD substrate ( $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Error bars indicate RSD based on 3 repetitions.

## References

- [1] Hill DJ, Hosking CS (1996) *Clinical and Experimental Allergy* 26:243–246
- [2] Karlsson R, Michaelsson A, Mattson L (1991) *J Immunol Meth* 145:229–240
- [3] Parsa H, Chin CD, Mongkolwisetwara P, Lee BW, Wang JL, Sia SK (2008) *Lab Chip* 8:2062–2070
- [4] Lionello A, Josserand J, Jensen H, Girault HH (2005) *Lab Chip* 5:254–260
- [5] Li HY, Dauriac V, Thibert V, Senechal H, Peltre G, Zhang XX, Descroix S, *Lab Chip* (2010) 10 :2597-2604
- [6] Sato K, Tokeshi M, Kimura H, Kitamori T (2001) *Anal Chem* 73:1213–1218
- [7] Ohashi T, Mawatari K, Sato K, Tokeshi M, Kitamori T (2009) *Lab Chip* 9:991–995
- [8] Kim KS, Park JK (2005) *Lab Chip* 5:657–664
- [9] Choi JW, Oh KW, Thomas JH, Heineman WR, Halsall HB, Nevin JH, Helmicki AJ, Henderson HT, Ahn CH (2002) *Lab Chip* 2:27–30
- [10] Yang SY, Lien KY, Huang KJ, Lei HY, Lee GB (2008) *Biosens Bioelectron* 24:855–862
- [11] Do J, Ahn CH (2008) *Lab Chip* 8:542–549
- [12] Barbora J, Rosnerova S, Slovakova M, Zverinova Z, Hubalek M, Hernychova L, Rehulka P, Viovy JL, Bilkova Z (2008) *J Chromatogr A* 1206:64–71
- [13] Yang Z, Liu H, Zong C, Yan F, Ju H (2009) *Anal Chem* 81:5484–5489
- [14] Kwon Y, Hara CA, Knize MG, Hwang MH, Venkateswaran KS, Whellr EK, Bell PM, Renzi RF, Fruetel JA, Bailey CG (2008) *Anal Chem* 80:8416–8423
- [15] Peyman SA, Iles A, Pamme N (2009) *Lab Chip* 9:3110–3117
- [16] Chen HX, Busnel JM, Peltre G, Zhang, XX, Girault HH (2008) *Anal Chem* 80:9583–9588
- [17] Monte X, Funovics M, Montet-Abou K, Weissleder R, Josephson L (2006) *J Med Chem* 49:6087–6093
- [18] Tassa C, Duffner JL, Lewis TA, Weissleder R, Schreiber ST, Koehler AN, Shaw SY (2010) *Bioconjugate Chem* 21:14–19
- [19] Hong S, Leroueil PR, Majoros IJ, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM (2007) *Chem Biol* 14:107–115

- [20] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2050–2055
- [21] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14265–14270
- [22] Gupta S, Huda S, Kilpatrick PK, Velve OD (2007) *Anal Chem* 79:3810–3820
- [23] Bowma MC, Ballard TE, Ackerson CJ, Feldheim DL, Margolis DM, Melander C (2008) *J Am Chem Soc* 130:6896–6897
- [24] Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L (2005) *Nat Biotechnol* 23:1418–1423
- [25] Ibraimi F, Kriz D, Lu M, Hansson LO, Kriz K (2006) *Anal Bioanal Chem* 384:651–657
- [26] Myszka DK (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:50–57
- [27] Lin PC, Chou PH, Chen SH, Liao HK, Wang KY, Chen YJ, Lin CC (2006) *Small* 4:485–489
- [28] Tang D, Yu Y, Niessner R, Miró M, Knopp D (2010) *Analyst* 135:2661–2667
- [29] Liu X, Dai Q, Austin L, Coutts J, Knowles G, Zou JH, Chen H, Huo Q (2008) *J Am Chem Soc* 130:2780–2782
- [30] Mao X, Baloda M, Gurung AS, Lin YH, Liu G (2008) *Electrochem Comm* 10:1636–1640
- [31] Cai HH, Yang PH, Feng J, Cai JY (2009) *Sens Act B* 135:603–609
- [32] Ye CH, Hung CY, Chang TC, Lin HP, Lin YC (2009) *Microfluid Nanofluid* 6:85–91
- [33] Maurice V, Georgelin T, Siaugue JM, Cabuil V (2009) *J Magn Magn Mater* 321:1408–1413
- [34] Georgelin T, Maurice V, Malezieux B, Siaugue JM, Cabuil V (2010) *J Nanopart Res* 12:675–680
- [35] Georgelin T, Bombard S, Siaugue JM, Cabuil V (2010) *Angew Chem* 49:9091–9085
- [36] d'Orlyé F, Varenne A, Georgelin T, Siaugue JM, Teste B, Descroix S, Gareil P (2009) *Electrophoresis* 30:2572–2582
- [37] Petr J, Teste B, Descroix S, Siaugue JM, Gareil P, Varenne A *Electrophoresis* (2010) 31 :2754–2761
- [38] Teste B, Vial J, Descroix S, Georgelin T, Siaugue JM, Petr J, Varenne A, Hennion MC (2010) *Talanta* 81:1703–1710
- [39] Bourdillon C, Demaille C, Moiroux J, Savéant JM (1999) *J Am Chem Soc* 121 :2401–2408

- [40] Cornec M, Cho D, Narsimhan G (1999) *J Coll Interf Sci* 214:129–142
- [41] Hsieh HV, Thompson NL (1995) *Biochemistry* 34:12481–12488
- [42] Wandersman E, Dupuis V, Dubois E, Perzynski R (2009) *Phys Rev E* 80: 041504–041512
- [43] Krishnamurthy S, Bhattacharya P, Phelan PE, Prasher RS (2006) *NanoLett* 6:419–423
- [44] Northrup S, Erickson H (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3338–3342
- [45] Voss EW (1993) *J Mol Recognit* 6: 51–58
- [46] Baudry J, Rouzeau C, Goubault C, Robic C, Cohen-Tannoudji L, Koenig A, Bertrand E, Bibette J (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16076–16080
- [47] Cohen-Tannoudji L, Bertrand E, Baudry J, Robic C, Goubault C, Pellisier M, Johner A, Thalmann F, Lee NK, Marques CM, Bibette (2008) *J Phys Rev Lett* 100:108301–108304

### **III°) Conclusion**

Ces travaux ont permis dans un premier temps d'étudier la cinétique de l'interaction Ag/Ac à l'échelle milli, micro et nanométrique. Nous avons démontré, à l'aide de modèles cinétiques, que les cinétiques d'interaction à la surface de la nanoplateforme étaient améliorées. Ceci s'explique principalement par le rapport surface sur volume qui augmente lorsque la taille du support diminue. Nous avons par la suite étudié l'influence de la chimie de surface des NPCC sur la capacité et la spécificité de capture de l'Ac cible. Nous avons montré que les NPCC présentant le rapport APTS/PEOS le plus faible offraient une meilleure spécificité de capture en limitant les interactions non-spécifiques vis-à-vis des molécules interférentes. D'autres facteurs tels qu'une force ionique élevée ou encore la présence de NaCl dans le tampon d'analyse permettent également d'améliorer la spécificité de l'immunoessai. L'utilisation de NPCC a permis d'obtenir une sensibilité 10 fois plus élevée que celle obtenue en microplaque et le temps d'analyse peut être réduit d'un facteur 8. Néanmoins, les temps de lavage représentent 60 % du temps total d'analyse et l'intégration en microsystème devrait permettre de les raccourcir. Au final, la stabilité des NPCC dans des matrices biologiques complexes telles que le sérum a permis de déterminer la quantité d'IgE présentes au sein de sérums de patients allergiques au lait de vache, ces résultats ont été validés par comparaison avec ceux obtenus avec une méthode de référence : l'ELISA en microplaque.



# CHAPITRE 4 :

## ELABORATION DU MICROSYSTEME ET INTEGRATION DE L'IMMUNOESSAI A L'ECHELLE MICROFLUIDIQUE

### I°) Introduction

Après la mise en œuvre d'un immunoessai développé en batch et utilisant des NPCC en tant que support de l'interaction, la dernière étape du projet a consisté à transposer cet immunoessai à l'échelle du microsysteme. Nous avons montré dans le chapitre précédent que le caractère colloïdal des NPCC permettait d'accélérer les cinétiques d'interactions des différentes étapes de la procédure analytique. Nous avons également démontré la "compatibilité" des NPCC avec des matrices biologiques complexes telles que le sérum, notamment pour le dosage des IgE. En revanche, la consommation des réactifs restait quand à elle relativement importante et les étapes de rinçage représentaient 60 % du temps total d'analyse.

L'intégration de cette procédure au sein d'un microsysteme a pour objectif de réduire la consommation des réactifs, de diminuer les temps d'analyse (notamment l'étape de rinçage) et d'améliorer la sensibilité de l'analyse.

Notre démarche a consisté à élaborer un microsysteme qui permettrait de combiner à la fois les avantages des immunoessais en phase homogène et hétérogène. La phase homogène permet la diffusion des deux partenaires immunologiques en solution favorisant ainsi les interactions et donc l'efficacité de capture de la cible. La phase hétérogène quand à elle facilite les étapes de séparation et de préconcentration de la cible à doser.

Comme nous l'avons démontré précédemment, le caractère colloïdal des NPCC permettra de capturer la molécule cible de manière efficace et rapide au sein du microcanal tout en s'affranchissant de l'étape d'agitation du milieu réactionnel. La cinétique d'interaction entre l'Ag et l'Ac cible ne sera pas modifiée au sein du microcanal car ce sont les distances interparticulaires qui fixent les distances de diffusion, celles-ci étant identiques en batch ou au sein du microcanal pour une concentration donnée en NPCC.



L'interaction entre l'Ac cible et l'Ac de détection s'effectuera elle en phase hétérogène après avoir préalablement confiné magnétiquement les NPCC au sein du microsysteme. Cette étape de confinement des nanoparticules permettra d'une part de séparer les formes libres et le complexe Ag-Ac et d'autre part de préconcentrer l'Ac cible avant l'étape de détection. Pour confiner les NPCC au sein du microcanal, nous avons élaboré une chambre de capture composée de billes de fer ferromagnétiques permettant de créer de forts gradients de champ magnétique susceptibles de capturer magnétiquement les nanoparticules.

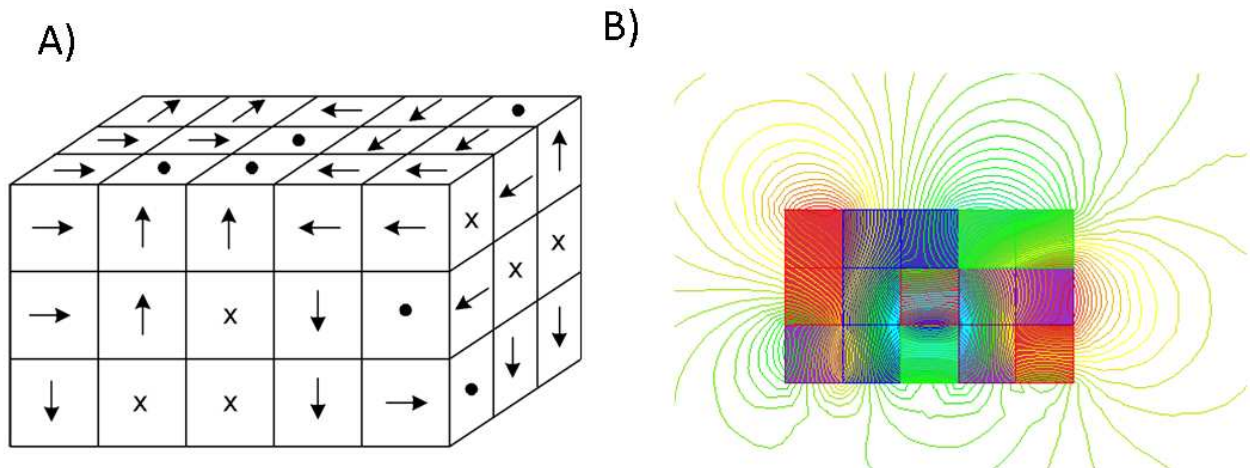
La première étape concernant l'élaboration du microsysteme a porté sur le développement de la chambre magnétique. La seconde étape s'est portée sur l'intégration de l'immunoessai au sein de ce microsysteme.

## **II°) Développement d'un microsysteme générant de forts gradients de champ magnétique dédié à la capture de nanoparticules magnétiques**

### II.1°) Préambule et théorie sur le magnétisme

Il y a peu d'éléments dans le tableau périodique qui offrent des propriétés magnétiques. Ces dernières sont étroitement liées à la configuration électronique de l'atome et à la structure cristalline du matériau. Chaque électron possède un moment magnétique, si les électrons sont appariés, les spins et donc les moments magnétiques de ces électrons appariés s'orientent vers des directions opposées, il en résulte un champ magnétique nul.

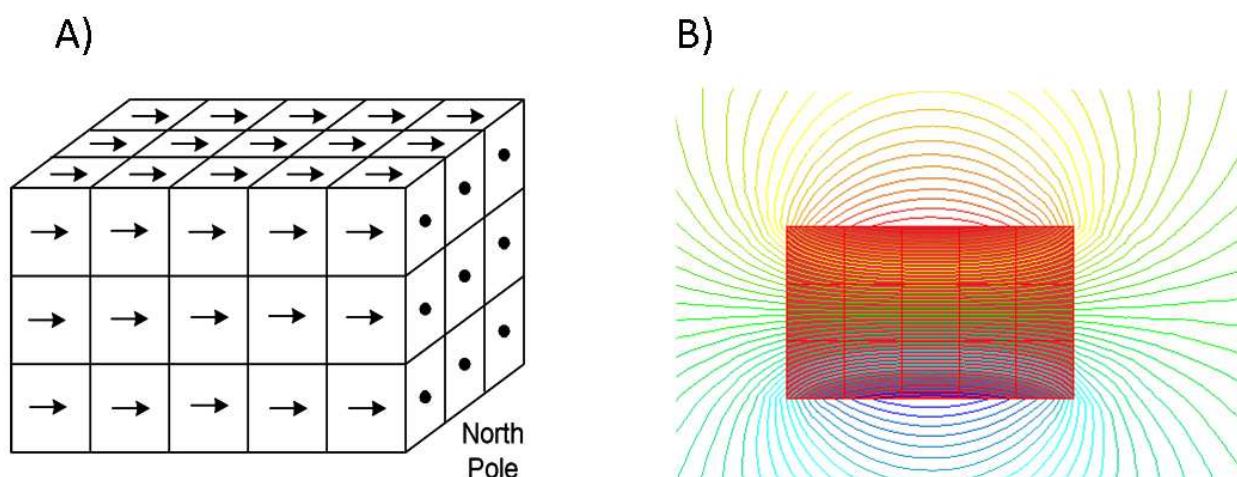
Le fer, le cobalt, le nickel ou encore le gadolinium possèdent des électrons non appariés sur la couche électronique externe, il en résulte un moment magnétique qui n'est pas compensé à cause de l'absence d'appariement avec un autre électron. On observe donc localement un champ magnétique à l'échelle atomique. Sous sa forme cristalline, un matériau de fer par exemple est constitué de domaines au sein desquels se trouvent des atomes dont les moments magnétiques pointent dans la même direction. Chaque domaine est caractérisé par un moment magnétique total qui est la somme des moments magnétiques de chaque atome comme illustré en Figure 1. Chaque cube représente un domaine magnétique dont les moments s'orientent de façon aléatoire.



**Figure 1. (A) Schéma montrant l'orientation aléatoire des domaines magnétiques d'un matériau non magnétisé comme le fer. x : le vecteur moment magnétique pointe en fuyant l'observateur. • : le vecteur moment magnétique pointe en direction de l'observateur. (B) Champ magnétique résultant à l'échelle du matériau lorsque celui-ci n'est pas magnétisé.**

Chaque domaine est composé d'un pôle Sud et d'un pôle Nord et se comporte comme un aimant permanent, mais la somme cumulée des moments magnétiques de ces domaines non alignés offrent au final un champ magnétique résiduel à l'échelle macroscopique bien en deçà de la somme des aimantations de chacun des domaines.

En revanche, lorsque ce matériau est exposé à un champ magnétique permanent, les moments magnétiques des domaines vont s'aligner et pointer dans la même direction, plus le champ permanent appliqué est élevé et plus le nombre de domaines alignés va augmenter jusqu'à saturation du matériau où tous les domaines sont alignés comme le montre la Figure 2. Plus le nombre de domaine est élevé, plus l'énergie à fournir pour les aligner sera importante. L'alignement de ces vecteurs moments magnétiques crée un phénomène de cumul, ce qui tend vers l'apparition d'un monodomaine parfait à l'échelle du matériau. Il en résulte un champ magnétique global au niveau macroscopique avec un pôle Sud et un pôle Nord.



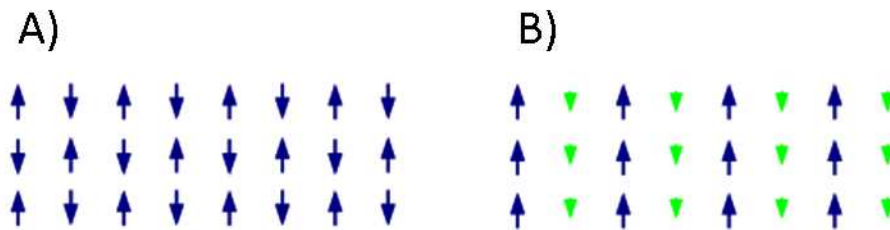
**Figure 2. (A) Schéma des domaines magnétiques d'un matériau magnétisé par un champ magnétique permanent extérieur. (B) Champ magnétique à l'échelle du matériau résultant de l'alignement des moments magnétiques.**

On dit que le matériau est magnétisé et cette magnétisation va dépendre du matériau. Avec les matériaux magnétiques « doux » comme le fer, le champ magnétique au sein du matériau disparaît lorsque le champ magnétique permanent externe est supprimé. Pour certains matériaux doux une légère rémanence (ou 'mémoire' magnétique) peut persister. Avec les matériaux magnétiques « durs » comme les alliages de neodymium, de bore et de fer, le champ magnétique au sein du matériau persiste même après avoir supprimé le champ magnétique externe. Les moments magnétiques restent alignés, on obtient un aimant permanent. On parle ainsi de rémanence magnétique aussi appelé hystérèse. La réponse des matériaux à un champ magnétique externe a mené à une classification.

Les éléments ferromagnétiques comme le fer, le nickel, le cobalt sont les matériaux que nous venons de décrire.

Le diamagnétisme regroupe l'ensemble des matériaux qui, suite à leur exposition à un champ magnétique externe, vont établir un champ plus faible opposé créant ainsi un effet répulsif dû à l'altération des couches internes des orbitales électroniques.

Les éléments antiferromagnétiques possèdent des moments magnétiques qui pointent en sens opposés de façon ordonnée. Les moments sont antiparallèles et de même amplitude. Il en résulte une aimantation nulle.



**Figure 3. Schéma illustrant l'orientation des moments magnétiques des matériaux (A) antiferromagnétiques et (B) ferrimagnétiques.**

Les éléments ferrimagnétiques présentent également des moments antiparallèles mais d'amplitudes différentes et vont se comporter comme des éléments ferromagnétiques lorsqu'ils seront magnétisés par un champ externe.

Le paramagnétisme est caractéristique des éléments qui vont pouvoir s'aimanter au même titre que les ferromagnétiques mais qui ne présenteront pas de rémanence après suppression du champ extérieur.

Enfin, le superparamagnétisme est le phénomène paramagnétique observé à l'échelle des nanoparticules. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2, lorsque les nanoparticules comme les grains d'oxyde de fer sont suffisamment petites (inférieures à 50 nm) elles possèdent un seul domaine et donc un seul moment magnétique. Du fait de l'agitation thermique importante à cette échelle, ces moments peuvent basculer dans toutes les directions, ils ne sont pas alignés et l'aimantation résultante est nulle. Après magnétisation et suppression du champ extérieur, ces éléments ne présentent pas de rémanence.

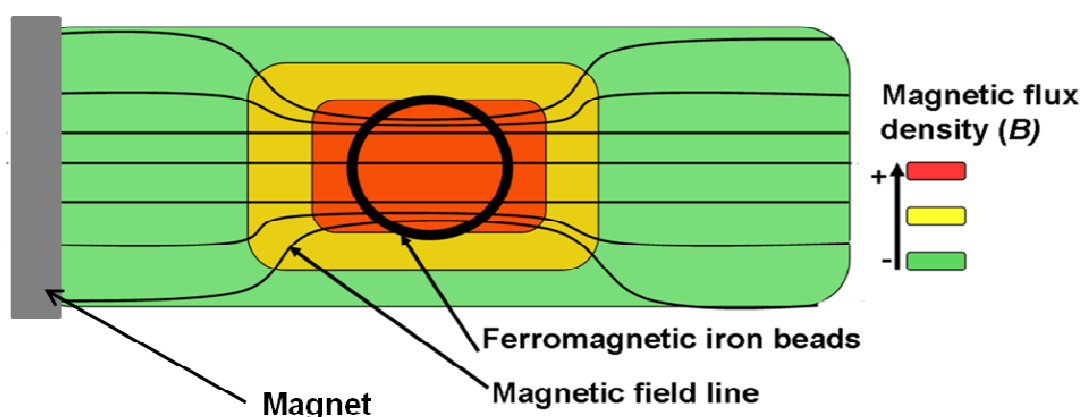
Différents paramètres sont utilisés pour évaluer les propriétés magnétiques d'un élément. Il existe encore beaucoup de confusions concernant les définitions du champ magnétique ( $H$ ) et de la densité de flux magnétique ( $B$ ) qui diffèrent selon les disciplines. Dans notre cas  $H$  est une force magnétisante définie en A/m et reflète l'intensité du champ magnétique.  $B$  lui reflète la densité de lignes de champ magnétique par unité de surface exprimée en Tesla. Lorsqu'un élément ferromagnétique par exemple est soumis à un champ magnétique  $H$  excitateur provenant d'un aimant permanent, il a la capacité de concentrer les lignes de champ de cet aimant à travers lui

selon sa susceptibilité magnétique  $\chi$ . Il en résulte au niveau de ce matériau une densité de flux magnétique  $\mathbf{B}$  induite. La susceptibilité magnétique reflète la capacité que possède un matériau à s'aimanter en réponse à une excitation magnétique externe d'un champ permanent. La susceptibilité d'un corps ferromagnétique est positive et supérieure à celle des objets paramagnétiques, celle des diamagnétiques est négative.  $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{H}$  sont reliés par l'équation suivante :

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H} + \mu_0 \mathbf{M}$$

avec  $\mu_0$  la perméabilité du vide et  $\mathbf{M}$  l'aimantation du matériau.  $\mathbf{B}$  est égal au champ magnétique appliqué provenant de l'aimant permanent et à l'aimantation du matériau, en d'autres termes  $\mathbf{B}$  inclut une contribution due au matériau (ferromagnétique dans l'exemple) alors que  $\mathbf{H}$  ne prend en compte que l'aimant permanent et ne dépend pas de la présence du matériau.

Les nanoparticules que nous avons synthétisées possèdent un cœur d'oxyde de fer dont l'orientation des moments magnétiques à l'échelle de la solution n'est jamais totale. Cela est dû à l'agitation thermique et au mouvement brownien important des nanoparticules. Ainsi le confinement magnétique de ces objets avec un aimant classique (NdFeB, 0,25 Tesla à la surface) n'est pas envisageable. Il a donc fallu élaborer un microsysteme capable de générer un fort gradient de champ magnétique qui permettrait leur confinement. Notre système s'inspire de systèmes commercialisés tels que le MACS system (Mitenyi) dédié au tri de cellules ayant interagi avec des nanoparticules magnétiques au sein de cartouches ferromagnétiques. Ainsi, nous avons intégré au sein de ce microsysteme une chambre magnétique composée d'un plug de billes de fer ferromagnétiques de taille micrométrique. Ces microparticules de fer ont la propriété de concentrer les lignes de champ d'un aimant permanent externe comme nous l'avons évoqué plus haut et schématisé en figure 4.



**Figure 4. Schéma montrant la capacité des billes de fer ferromagnétiques à concentrer les lignes de champ d'un aimant permanent.**

Le fait de pouvoir concentrer les lignes de champ permet d'augmenter  $\mathbf{B}$  et donc la force magnétique subie par une nanoparticule comme le montre l'expression suivante :

$$\mathbf{F}_{mag} = \frac{V\Delta\chi}{\mu_0}(\mathbf{B}\cdot\nabla)\mathbf{B}$$

avec  $\mathbf{F}_{mag}$  la force magnétique subie par la nanoparticule magnétique,  $V$  le volume de la nanoparticule,  $\Delta\chi$  la différence de susceptibilité magnétique entre la nanoparticule et le milieu environnant,  $\mu_0$  la perméabilité du vide et  $\mathbf{B}$  la densité de flux magnétique.

Cette expression montre que pour faire migrer magnétiquement un objet, il est nécessaire d'établir un gradient de champ magnétique, c'est le principe de la magnétophorèse. Les particules se déplacent de la zone où la densité de ligne de champ est la plus faible vers la zone où elle est la plus élevée. Si des particules sont soumises à un champ magnétique homogène, ces dernières deviennent immobiles et s'alignent sur les lignes de champ de l'aimant. Dans certains cas ces particules vont s'auto-organiser en colonnes. Cette chambre magnétique est composée de billes de fer de  $7\ \mu\text{m}$  empaquetées contre une restriction physique au sein d'un microcanal. En présence d'un aimant permanent extérieur, les billes de fer s'aimantent et se comportent comme un microaimant présentant de forts gradients de champ magnétique permettant le confinement des NPCC. En retirant l'aimant, les billes de fer perdent leur aimantation et les nanoparticules sont relarguées de la chambre magnétique. Cette chambre a été étudiée selon deux approches : la première basée sur des simulations numériques qui ont permis de cartographier la répartition dans un espace 2D des vecteurs  $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{F}_{mag}$  et de montrer le gain apporté par les billes de fer ferromagnétiques sur  $\mathbf{B}$  et  $\mathbf{F}_{mag}$  par rapport à un système ne possédant pas ces billes de fer. L'influence de la taille et de la charge magnétique des billes ainsi que la longueur du plug de billes de fer sur la valeur de  $\mathbf{F}_{mag}$  a été évaluée par les simulations. Ce travail a été effectué en collaboration avec A-L Gassner au sein du laboratoire LEPA de l'EPFL sous la direction de H. Girault. La seconde approche, expérimentale, est basée sur l'observation microscopique du confinement des NPCC. Pour cela des NPCC fluorescentes ont été élaborées en dopant la couche de silice à l'aide d'un fluorophore (FITC) puis ont été injectées au sein de la chambre magnétique. L'évaluation de la quantité de NPCC confinées au sein de cette chambre s'est effectuée par des mesures de fluorescence, l'intensité du signal fluorescent reflétant la quantité de NPCC capturées. L'effet de la nature de l'aimant extérieur, de sa distance par rapport au microcanal et du débit sur l'efficacité de capture des NPCC a été évalué expérimentalement. Les résultats de ces études sont consignés dans l'article suivant.

## II.2°) Article 3 :

## Lab on a Chip

Dynamic Article Links Cite this: *Lab Chip*, 2011, **11**, 833

www.rsc.org/loc

PAPER

**Magnetic core shell nanoparticles trapping in a microdevice generating high magnetic gradient<sup>†‡</sup>**Bruno Teste,<sup>a</sup> Florent Malloggi,<sup>b</sup> Anne-Laure Gassner,<sup>c</sup> Thomas Georgelin,<sup>d</sup> Jean-Michel Siaugue,<sup>d</sup> Anne Varenne,<sup>a</sup> Hubert Girault<sup>c</sup> and Stéphanie Descroix<sup>\*a</sup>

Received 15th October 2010, Accepted 15th December 2010

DOI: 10.1039/c0lc00510j

Magnetic core shell nanoparticles (MCSNPs) 30 nm diameter with a magnetic weight of 10% are usually much too small to be trapped in microfluidic systems using classical external magnets. Here, a simple microchip for efficient MCSNPs trapping and release is presented. It comprises a bed of micrometric iron beads (6–8  $\mu\text{m}$  diameter) packed in a microchannel against a physical restriction and presenting a low dead volume of 0.8 nL. These beads of high magnetic permeability are used to focus magnetic field lines from an external permanent magnet and generate local high magnetic gradients. The nanoparticles magnetic trap has been characterised both by numerical simulations and fluorescent MCSNPs imaging.

Numerical simulations have been performed to map both the magnetic flux density and the magnetic force, and showed that MCSNPs are preferentially trapped at the iron bead magnetic poles where the magnetic force is increased by 3 orders of magnitude. The trapping efficiency was experimentally determined using fluorescent MCSNPs for different flow rates, different iron beads and permanent magnet positions. At a flow rate of 100  $\mu\text{L h}^{-1}$ , the nanoparticles trapping/release can be achieved within 20 s with a preconcentration factor of 4000.

**Introduction**

Microfluidics is a field that has received growing interest during the last years. Original microdevices have been developed for a wide range of applications such as diagnosis, cell and tissue investigation. Microfluidics combines the advantages of low sample and reagent consumption, high throughput analysis and integration capability. In parallel, the potential of magnetic particles has been intensively demonstrated during the last decade. Magnetic particles are considered as versatile and powerful tools at the macro and micro-scale. They have been widely used for chemical, biological and biochemical applications.<sup>1–4</sup> Magnetic particles are commercially available and their surface chemistry can be tuned to achieve high specific binding capacity while avoiding non-specific adsorption. As recently

highlighted by Gijs *et al.*,<sup>5</sup> the combination of microfluidics and magnetic particles has led to highly multidisciplinary research with a wide range of applications such as cell handling and separation, nucleic acid processing, bioassays and catalysis. Promising developments based on the integration of magnetic particles in microdevices have already been described and further are expected. Pamme has also reported that different operation units can be achieved by magnetic forces,<sup>6</sup> like mixing and pumping, incorporation of valves, trapping and transporting, separation and sorting, magnetic plug formation as solid support for bioassay.<sup>7,8</sup> Indeed, magnetic particles provide a large surface to volume ratio while avoiding the complex development of monolith as stationary phase or the integration of physical restriction to pack beads. Moreover, as previously mentioned, their surface chemistry can be adapted to the analytical requirements. In this context, particle trapping is considered as a crucial issue. Different strategies have been developed to capture magnetic beads. The most widely used method consists in placing a permanent magnet,<sup>9</sup> or an electromagnet,<sup>10</sup> outside the microchannel. The need for high magnetic flux density ( $B$ ) until 1 Tesla (T) is provided by permanent magnets like neodymium iron boron magnets (NdFeB) whereas electromagnets generate lower  $B$ . The latter are preferred if  $B$  has to be tuned or switched on and off rapidly. For both types of magnets,  $B$  decreases as the distance from the magnet increases. This simple approach led to many assay applications<sup>11–13</sup> A second

<sup>a</sup>Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA), UMR 7195 CNRS-ESPCI-ENSCP, France. E-mail: stephanie.descroix@espci.fr

<sup>b</sup>MMN - UMR 7083 - Gulliver CNRS-ESPCI, Paris, France

<sup>c</sup>Laboratoire d'Electrochimie Physique et Analytique, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Station 6, CH-1015 Lausanne, Switzerland

<sup>d</sup>Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA), UMR 7195 CNRS-Paris6-ESPCI, Paris, France

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available: Electronic supplementary information. See DOI: 10.1039/c0lc00510j

<sup>‡</sup> Published as part of a LOC themed issue dedicated to French Research: Guest Editor Professor Jean-Louis Viovy.

approach consists of integrating soft magnetic structures into microdevices to locally increase the magnetic field. The magnetic structures are usually made of ferromagnetic material like iron,<sup>14</sup> nickel,<sup>15</sup> or permalloy.<sup>16</sup> These materials generate a high magnetic field when they are submitted to an external magnetic excitation and a low remanent field can remain when the external permanent magnet is removed. This microfabrication approach requires several complex fabrication steps using different techniques like polymer photo-ablation,<sup>14</sup> or a combination of lithography and etching.<sup>17</sup>

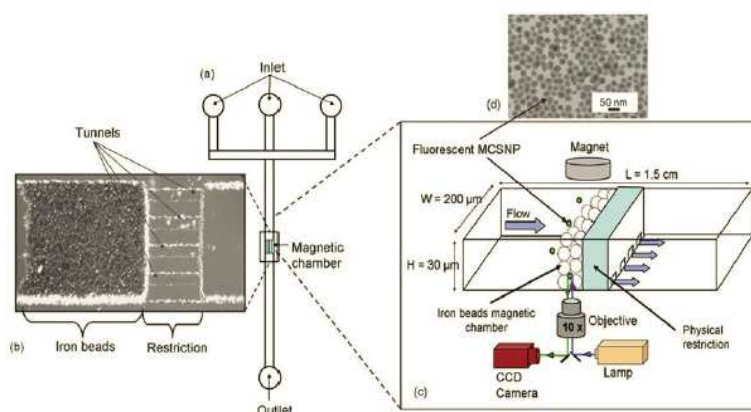
Finally, different studies have shown that it is quite easy to capture efficiently magnetic particles in microdevices of various geometries.<sup>18</sup> Nevertheless, in the literature, most of the particles magnetically trapped were micrometric since the magnetic force on a particle is proportional to its volume and relative magnetic weight. Lately, nanoparticles became an interesting tool for various biological technologies.<sup>19,20</sup> They present a higher surface to volume ratio and they have been already used for various applications from single molecule study,<sup>21</sup> to cell manipulation.<sup>22</sup> At the macroscale, special attention has been paid to separate ferromagnetic and paramagnetic nanomaterials from various matrices by high-gradient magnetic separation (HGMS).<sup>23</sup> For that purpose, high magnetic field gradients are achieved by using small magnetic elements such as stainless-steel wool or wire. Based on this technique, the magnetic cell sorting technology (MACS) is currently widely used to retain cells bound to superparamagnetic nanoparticles prior to flow cytometry. The main limitation of the MACS system is related to high volume consumption due to the macroscale of the system. Very few papers report on the development of sub-100 nm nanoparticles trapping at the microscale. Only sophisticated microdevices have been developed to trap such nanoparticles. Recently, Donolato *et al.*,<sup>24</sup> reported on a device with a corner-shaped permalloy nanostructure terminated by two circular disks to trap and detect a small number of nanoparticles.

In this paper, we present a simple and efficient microdevice based on HGMS principle that avoids complicated and time consuming processes for the trapping of colloidal 30 nm magnetic core shell nanoparticles (MCSNPs). Micrometric iron beads (6–8  $\mu\text{m}$ ) packed by a physical restriction within a microchannel were used to develop a miniaturized magnetic chamber, which offers a very small dead volume and generate a very high  $B$  gradient. An external permanent magnet was used to magnetize and therefore address the magnetic flux density through the ferromagnetic iron beads (Fig. 1 a, b). Due to the non-uniform magnetic field achieved, the nanoparticles migrate by magnetophoresis and are finally trapped within the magnetic chamber.<sup>25</sup> The magnetic chamber has a volume  $10^7$  times smaller than those used in conventional MACS cell sorting. It has been investigated both by finite element numerical simulations and fluorescent MCSNPs imaging. Numerical simulations were used to calculate the  $B$  value as well as its spatial distribution. The same study was performed to map the magnetic force  $F_{mag}$  in order to evaluate the zone where the MCSNPs should be preferentially trapped. To optimize the microdevice development, the influence of magnetic chamber elements like beads size, nature and bead plug length on  $F_{mag}$  was also evaluated. The feasibility of developing such a magnetic chamber was finally experimentally validated using fluorescent MCSNPs. Different parameters such as bead nature constituting the magnetic chamber, magnet position and flow rate were investigated.

## Materials and methods

### Microsystem fabrication and set up

The microdevice was fabricated in two main steps: master fabrication and replica moulding. Master fabrication was performed using the standard multilayer soft lithography method.<sup>26,27</sup> The microstructures (channel and restriction) were designed in a computer aided design (CAD) program.



**Fig. 1** Experimental microdevice and set up dedicated to MCSNPs trapping and release. (a) Scheme of the device. It is composed of an inlet, outlet and a physical restriction located in the middle of the microchannel. (b) Picture of magnetic chamber (top view). 6–8  $\mu\text{m}$  iron beads were packed against physical restriction; magnetic plug length is about 300  $\mu\text{m}$ . (c) Scheme of the magnetic chamber and set up used for visualization of MCSNPs trapping and release. Permanent magnet was placed on the top of the microchip to magnetize iron beads magnetic chamber. Excitement light from mercury lamp was focused into the magnetic plug area using microscope objective (x 10) and fluorescent light emitted from MCSNPs was collected using CCD camera. The fluids pass through 4 tunnels of 3  $\mu\text{m}$  in height and 25  $\mu\text{m}$  in width. (d) Transmission electron microscopy image of MCSNPs made of maghemite nanoparticles (dark) encapsulated in silica shell (dark grey).



Transparencies of the CAD-generated patterns were then created using commercial services. The first layer was obtained by spin coating the negative SU-8 2002 photoresist (Microchem, viscosity 7.5 cSt) at 2000 rpm. The manufacturer predicts a layer height of 2.4  $\mu\text{m}$ . The restriction design was insulated (435 nm, 7s) onto the wafer and then developed. We measured the height of the restriction with a stylus profiler Dektak4M (Veeco). The measured restriction height (3  $\mu\text{m}$ ) was in good agreement with the photoresist manufacturer predictions. On the same wafer we spin coat the second layer. We used the negative SU-8 2015 photoresist (Microchem, viscosity 1250cSt) at 1500 rpm. The channel design is then aligned with a mask aligner MJB4 (SUSS MicroTec) onto the restrictions and then insulated (435 nm, 10 s). The wafer is developed and the height measured. The second layer height is approximately 30  $\mu\text{m}$ . The polydimethylsiloxane Sylgard 184 elastomer (PDMS, Dow Corning) was poured and further cured on a SU-8 mold (Microchem). Holes were punched for the inlets and the PDMS replicates were sealed to glass slides following oxygen plasma treatment at 200 mTorr for 30 s using plasma cleaner (Harrick scientific).

Spherical iron beads ( $7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ , Good Fellow) offering a saturation magnetization of about  $1.1 \times 10^6 \text{ A m}^{-1}$  were used for the magnetic chamber development. Four different permanent magnets (Chen Yang) were used: 3 cylindrical NdFeB magnets (magnet 1: 2 cm diameter and 1 cm high; magnet 3: 0.5 cm diameter and 1.2 cm high; magnet 4: 0.4 cm diameter and 0.3 cm high) and one NdFeB square magnet (magnet 2: 2 cm long and 0.4 cm thick). All the magnets present a magnetic remanence of 1.3 T. The formation of the magnetic bead plug is performed under a sufficient flow rate in order to avoid the iron bead sedimentation. The samples were injected using syringes of different volumes. The latter were connected to the microsystem inlet by a capillary tube. The flow rate was controlled by a syringe pump (Kd scientific).

Microchip analyses were monitored by an IX-71 inverted fluorescence microscopic system (Olympus) equipped with spectral filters, 460–490 nm and a 100 W mercury lamp (Olympus). A CCD camera  $1388 \times 1038$  pixels Pike (RD Vision) was mounted on the microscope and Hiris software (RD Vision) was used for camera control and image processing.

#### Fluorescent magnetic core shell nanoparticle synthesis

Briefly, maghemite nanoparticles (mean physical diameter 7 nm) were prepared by co-precipitation of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions under alkaline conditions as described by Massart.<sup>28</sup> Nanoparticles were coated by citrate anions and dispersed in water.<sup>29</sup> These maghemite nanoparticles were encapsulated in silica shells. A first silica shell was prepared by condensation of tetraethoxyorthosilicate (TEOS, Sigma),<sup>30</sup> in ethanolic medium in the presence of ammonia as catalyst. The fluorescein dye bearing an isothiocyanate functional group (FITC, Sigma) was previously coupled to the amino group of 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTS, Sigma) through an addition reaction. Stable fluorescein dye was then incorporated within the first silica shell by co-hydrolyzing with TEOS. The latter was then functionalized by simultaneous condensation of APTS and a silica polyethylene glycol-derived compound, 2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]-trimethoxysilane (PEOS, ABCR). The concurrent addition of a small amount of TEOS resulted in the formation of a crosslinked

silica shell.<sup>31,32</sup> The PEOS/APTS molar ratio used was 3 : 1. The reaction of silica condensation was carried out overnight and the particle suspension was destabilized by diethyl ether. A red pellet was formed and separated by magnetic settling. The pellet was washed twice with a mixture of diethyl ether and ethanol (15 : 1) and redispersed in 10 mM MOPS buffer (pH 7.5). This colloidal solution of amino-PEOS functionalized MCSNP (approximately  $3.3 \times 10^{14}$  MCSNP/mL) was stable for months. The value of saturation magnetization obtained for core-shell nanoparticles was similar to maghemite nanoparticles, approximately equal to  $3 \times 10^5 \text{ A m}^{-1}$ .

#### Magnetic core shell nanoparticle trapping and release

The magnetic chamber was built by injecting iron beads ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) solubilized in PBS-Tween 0.1% (v/v) using a 100  $\mu\text{L}$  syringe until the desired plug length was obtained. Then fluorescent MCSNP ( $6.2 \times 10^{13}$  MCSNPs/mL) were injected at various flow rates (from 10 to 100  $\mu\text{L h}^{-1}$ ) using a 1 mL syringe. External magnets are placed from 0.5 to 2 cm from the top of the channel. Finally the MCSNPs were released by manually removing the external magnet.

The capture capacity was evaluated as follows. A solution of fluorescent nanoparticles at fixed concentration was flowed through the channel at a given flow rate. The fluorescent signal was measured in a zone located after the physical restriction. During the nanoparticles trapping the fluorescence remains null. When the magnetic chamber saturation is reached, the fluorescence increases. Knowing the time required to reach the saturation, the device dead volume as well as the nanoparticles concentration, the amount of trapped nanoparticles can be estimated.

Concerning the elution efficiency, fluorescent signal was measured in the plug before the trapping and 15 s after the MCSNPs release. Repeatability of MCSNPs trapping was evaluated by measuring the peak area following MCSNPs elution from the magnetic chamber.

## Results and discussion

#### Microdevice and magnetic chamber design

Due to their low volume and relative magnetic weight, magnetic nanoparticles cannot be trapped by the usual strategies applied to micrometric beads that consist in placing a magnet near the microchannel. High magnetic gradients are required to perform an efficient trapping of magnetic nanoparticles. Based on the principle of high magnetic gradient separator (HGMS), a microdevice (Fig. 1a, c) dedicated to colloidal magnetic nanoparticles trapping and release was developed. For that purpose, a monochannel 1.5 cm long, 200  $\mu\text{m}$  wide and 30  $\mu\text{m}$  high was microfabricated. In this study, the HGMS was composed of an external permanent magnet coupled to an internal magnetic chamber filled with micrometric magnetic iron beads (Fig. 1b). Indeed, for a material located in a magnetic field  $H$  generated by a permanent magnet, the magnetic flux density  $B$ , will be defined as<sup>33</sup>:

$$B = \mu_0(H + M) \quad (1)$$

Where  $\mu_0$  is the permeability of free space and  $M$  the magnetization of the material induced by  $H$ .

A superparamagnetic particle is submitted to a magnetic force  $F_{mag}$ ,<sup>34</sup> described as follows:

$$F_{mag} = \frac{V\Delta\chi}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (2)$$

$F_{mag}$  depends on the volume of the particle ( $V$ ), the difference in magnetic susceptibility ( $\Delta\chi$ ) between the particle and the surrounding medium as well as the magnitude and gradient of  $\mathbf{B}$ . Homogeneous  $\mathbf{B}$  will align the particles in the direction of the magnetic field, but a  $\mathbf{B}$  gradient is required to exert a translational force on a magnetic particle.

In a microfluidic system, a particle is also submitted to the gravitational force  $F_g$  and to the hydrodynamic drag force  $F_{drag}$  defined in eqn (3). According to the volume and colloidal nature of the MCSNPs (Fig. 1d),  $F_g$  was neglected compared to  $F_{mag}$  and  $F_{drag}$ .

$$F_{drag} = 6\pi\eta R\Delta v \quad (3)$$

with  $\eta$  the fluid viscosity,  $R$  the radius of the particle and  $\Delta v$  the linear velocity of the particle compared to the surrounding fluid velocity.

As previously mentioned, a high  $\mathbf{B}$  magnitude and gradient are required to trap magnetic nanoparticles. However, the  $\mathbf{B}$  value decreases with the square of the distance from the magnetic source or magnetized material.<sup>35</sup> To limit this effect, ferromagnetic iron beads have been integrated directly in the microchannel in order to increase the local value of  $\mathbf{B}$ . Iron beads were packed in the microchannel against a physical restriction made of tunnels 3  $\mu\text{m}$  high and 25  $\mu\text{m}$  wide allowing fluids to pass. This approach avoids complicated and time consuming micro-fabrication processes.

A high  $\mathbf{B}$  magnitude and gradient are generated by exposing the ferromagnetic iron beads to a magnetic field produced by an external NdFeB permanent magnet. The magnetic field lines are expected to be concentrated through the iron beads due to their high magnetic permeability and thus to locally increase  $\mathbf{B}$  and consequently  $F_{mag}$ . Different permanent magnets have been used, all of them presenting a width much larger than the length of the iron beads plug. In this case, the iron beads plug was located in the middle of the magnet, where the magnetic field lines are parallel near the surface and  $\mathbf{B}$  is homogeneous.

Spheric and small sized beads presenting low polydispersity (6–8  $\mu\text{m}$ ) were preferred for several reasons. A low polydispersity should favour iron beads plug formation with a good reproducibility. Small diameter beads allow the formation of a magnetic chamber with a low dead volume. Considering a plug length of 300  $\mu\text{m}$  and a filling factor approximated to 0.45 by fluorescent liquid filling measurements, the dead volume of the magnetic plug was roughly 0.8 nL. Moreover, high polydispersity beads increase the nanoparticle band broadening, as Eddy diffusion contributes to paths of different lengths through the magnetic beads plug.

Magnetic beads arrangement in microdevices has already been studied.<sup>35,36</sup> In homogeneous magnetic fields, magnetic beads are aligned in columns following the field lines direction. In the present microdevice, despite the presence of homogeneous  $\mathbf{B}$  in the centre of the magnet pole, no significant effect of the permanent magnet was observed on the beads arrangement since

the latter are packed against a physical restriction and the magnetic field was only applied after beads packing.

#### Magnetic flux density and magnetic force mapping

Finite elements numerical simulations were performed in 2D geometries, as shown in Fig. 2, to characterize  $\mathbf{B}$  and  $F_{mag}$ . Using a centimetre-sized permanent magnet, experimental conditions cannot be directly transposed to simulation due to software limitations. At the microchannel scale, the magnetic field lines can be considered as parallel on the  $y$ -axis using a cylindrical magnet 2 cm in diameter and 1 cm high (magnet 1). In order to reflect the present experimental conditions, simulations were thus performed with two magnets in attraction since the magnetic field lines between the two magnets are parallel, numerical model and parameters are described in supplementary information (SI 1, 2, 3)†. Finally, even if results from the simulation cannot be quantitatively compared with experimental results, simulations are used to validate the principle of this microdevice as well as to describe the  $F_{mag}$  gain, to depict  $\mathbf{B}$  and  $F_{mag}$  spatial distribution and to optimize the magnetic chamber development.

The first aim of these simulations was to evaluate the effect of an iron bead column on  $\mathbf{B}$  within the microchannel. For that purpose, two configurations have been compared: in the presence and absence of iron beads within the microchannel respectively. Considering a 2D system,  $\mathbf{B}$  vectors have two components ( $x$  and  $y$ ) and are tangential to the magnetic field lines. Fig. 3 presents the  $B_y$  isovalues obtained by numerical simulations. Positive and negative  $\mathbf{B}$  values reflect the direction of the vector on the  $y$ -axis, going up for positive values or going down when negative.

When two magnets are placed in attraction and in the absence of iron beads (Fig. 3a), the magnetic field lines go straight from one magnet towards the other, but at the edges of the magnet the magnetic field lines create a loop,<sup>37</sup> and their density as well as  $\mathbf{B}$  magnitude decrease. In the channel zone,  $\mathbf{B}$  presents

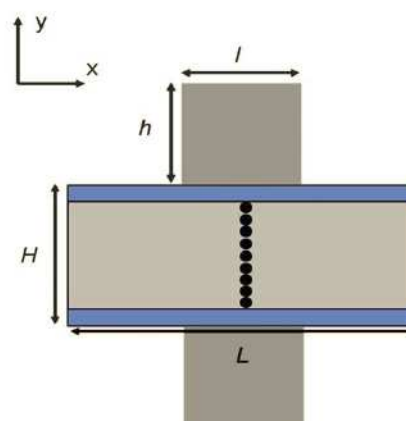


Fig. 2 Scheme of the system used for numerical simulations. The system is composed of microchannel (light grey) closed by insulating layers (blue) and surrounding by two permanent magnets (dark grey). An iron beads column (dark spot) is placed on the  $y$  symmetry axis of the magnets. The whole system is placed in an air box (dark lines).  $H$ ,  $L$ ,  $h$  and  $l$  represent respectively the height of the channel, the length of the channel, the height of the magnets and their length.

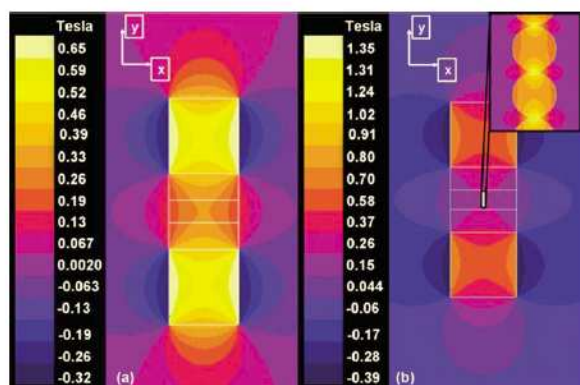


Fig. 3 Mapping of  $B$  isovalues (Tesla)  $y$  component in the two considered systems: without (a) and with (b) a column of iron beads. The inset is a focus on the beads. The direction of  $B$  vectors on the  $y$  axis is indicated by positive ( $B$  vectors going up) or negative ( $B$  vectors going down) values.

principally a  $y$ -component. The simulation indicates that the highest  $B$  value in the microchannel is obtained on the magnets  $y$  symmetry axis and is about 0.26 T.

In the presence of one iron bead column within the channel (Fig. 3b), the ferromagnetic beads concentrate the magnetic field lines from the external permanent magnet due to their high magnetic permeability thus amplifying the  $B$  value. Each bead behaves like a micromagnet. Indeed considering one bead, the resulting  $B$  presents a heterogeneous distribution on the  $y$ -axis. The highest  $B$  values are located at the bead magnetic poles and decrease until the "equator". The maximum  $B$  value was evaluated to be 1.35 T in the presence of iron beads, which is 6.5 times higher than the system without iron beads.

In order to evaluate where the nanoparticles are preferentially attracted, Fig. 4a presents the isovalues of the magnetic force  $F_{mag}$  ( $x$  component) applied to the MCSNPs in the absence of iron beads. Considering the symmetry on the  $y$ -axis in the centre of the channel and a dynamic case where a flow rate is continuously applied, three different situations can be determined. On

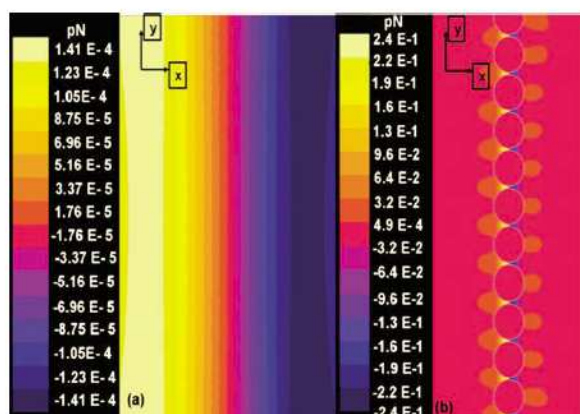


Fig. 4 Mapping of  $F_{mag}$  (pN)  $x$  component isovalues acting on a 30 nm MCSNPs at microchannel scale. Two situations are shown: without (a) and with (b) iron bead column. The direction of  $F_{mag}$  vector on  $x$  axis is indicated by positive (to the right) or negative (to the left) value.

the left part of the  $y$ -symmetry axis, the MCSNPs are submitted to positive values of magnetic force,  $F_{magx}$  and  $F_{drag}$  are superimposed resulting in MCSNPs acceleration along the  $x$ -axis. Along the  $y$ -symmetry axis,  $F_{magx}$  is equal to zero, the only force exerted on the  $x$ -axis being  $F_{drag}$ , the MCSNPs slow down. On the right part  $F_{magx}$  is negative and opposite to  $F_{drag}$ . In the case where  $F_{magx} > F_{drag}$ , the MCSNPs are forced back towards the middle of the magnets. Finally, the MCSNPs are preferentially attracted and trapped in the middle of the two magnets.

In the presence of iron beads, isovalues of  $F_{mag}$  on the  $x$ -axis are distributed with a  $y$  symmetry axis as well, but at a smaller scale (Fig. 4b). This axis goes through the centre of each bead. Considering one single bead, the  $F_{mag}$  distribution is heterogeneous on the  $x$ -axis. Positive, null and negative  $F_{magx}$  values are observed on the left, centre and right side of the  $y$ -symmetry axis respectively. At the plug scale, the  $F_{magx}$  maximum is located near the bead magnetic pole and is constant on the  $y$ -axis. The MCSNPs capture capacity should thus be maximal near the beads magnetic poles whatever their  $y$  position. The magnetic force in the presence of a single column of iron beads was evaluated to be 1700 higher than without it.

These simulations results evidence the interest of integrating magnetic beads within a channel to trap magnetic nanoparticles. To further optimize the experimental device, some parameters were varied. The size of the iron beads (diameter ranging from 1 to 8  $\mu\text{m}$ ) has been investigated. The simulations indicate that the resulting  $F_{magx}$  increases when the iron bead diameter decreases (ESI, Fig. S1†). Indeed,  $F_{mag}$  depends on the gradient of  $B$ , and in this case, a decrease in it is observed due to the fact that the gradient is mainly expanded on the bead radius. In parallel, simulations have investigated the influence of the entire plug length on  $F_{mag}$ . These simulations underline that with three columns of iron beads a decrease of 7% of  $F_{mag}$  is observed compared to the one achieved with one column. When increasing the plug length, the magnetic field lines will be distributed everywhere in the plug and not only concentrated through one column of beads, thus locally the magnetic field line density will decrease compared to a one-column case. These results indicate that a shorter plug should generate higher  $F_{mag}$  and thus favor nanoparticle trapping.

Finally, the nature of the beads constituting the magnetic chamber was studied. 6  $\mu\text{m}$  iron beads whose magnetic weight represents 99% of total weight were compared to 6  $\mu\text{m}$  magnetic polystyrene beads composed of magnetic iron core (20% of total weight) encapsulated in a polystyrene shell. The resulting  $F_{magx}$  was 7 times lower using polystyrene magnetic beads highlighting the influence of the beads relative magnetic weight on  $F_{mag}$ .

These numerical simulations have exemplified the ability of packed iron beads in a microchannel to increase  $B$  and  $F_{mag}$  showing that a short plug containing iron beads of small diameter may favour nanoparticles trapping.

#### Experimental trapping and release of magnetic nanoparticles

According to the simulations results, a short plug of micrometric magnetic beads has been formed using small diameter spherical beads (6–8  $\mu\text{m}$ ) made of 99% iron. The choice of bead diameter was also related to the backpressure generated by the beads packed against the physical restriction.

Fig. 5 presents the experimental results of the fluorescent MCSNPs trapping and release under a flow rate of  $50 \mu\text{L h}^{-1}$ , using permanent magnet 1 placed 5 mm from the channel. First, fluorescent MCSNPs were flowed through the channel in the absence of the external permanent magnet *i.e.* through non-magnetized iron beads. No increase in the fluorescence signal was observed within the iron beads plug highlighting that nanoparticles were not non-specifically adsorbed on iron beads. When the external magnet was placed on the top of the microdevice (Fig. 5a), the increase in fluorescence shows that MCSNPs were progressively trapped from the entrance of the magnetic chamber. No fluorescent signal was detected after the physical restriction underlining that all the MCSNPs were trapped (0–15 s) within the iron beads plug. The magnetic chamber saturation was reached after 25 s, the non-trapped MCSNPs flowing through the magnetic plug were detected in the channel behind the physical restriction and the fluorescent signal within the plug remains constant. The capture capacity, which is defined as the maximal amount of MCSNPs trapped using such a magnetic chamber was evaluated to  $1.1 \times 10^4$  MCSNPs  $\mu\text{m}^{-3}$  and the preconcentration factor achieved was approximately 4000.

Concerning the release step (Fig. 5 b), after the magnet's removal, only 2 s and a volume of 27 nL were necessary to elute all the nanoparticles. The absence of residual fluorescent signal in the magnetic chamber after release confirmed that the MCSNPs were not adsorbed onto iron beads even at a very high concentration and that no visible remanent magnetization persists in the iron beads magnetic plug. A good repeatability (RSD = 2%) of the capture capacity was obtained for four successive fluorescent MCSNPs trapping/release sequences. These experimental results correlate with the numerical simulations. Indeed, in the absence of iron beads within the microchannel, fluorescent MCSNPs cannot be trapped with a permanent magnet even at a low flow rate, whereas the integration of packed iron beads allows for a fast and efficient trapping of 30 nm MCSNPs.

Similar experiments were performed using polystyrene magnetic beads instead of the iron beads and in agreement with the simulations, the capacity of capture obtained was  $6.9 \times 10^2$  MCSNPs  $\mu\text{m}^{-3}$ , which is 15 times lower than with the iron beads.

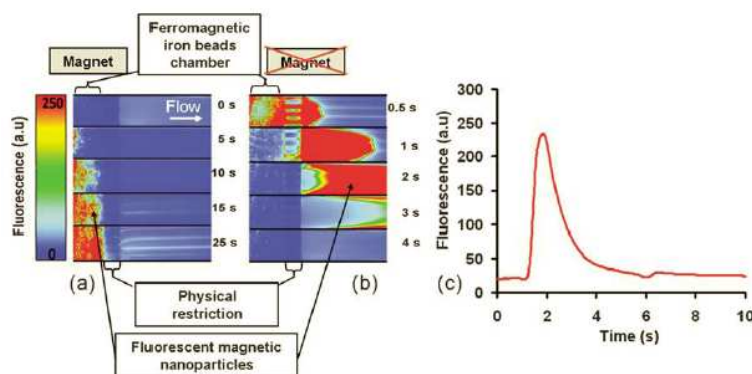


Fig. 5 Experimental trapping (a) and release (b) of fluorescent MCSNPs in a magnetic chamber of  $300 \times 200 \times 30 \mu\text{m}^3$  using inverted microscope imaging (top view). The flow rate was fixed at  $50 \mu\text{L h}^{-1}$  and the initial concentration of MCSNPs was put at  $6.2 \times 10^{13}$  MCSNPs/mL. (c) Fluorescent MCSNPs peak profile obtained after magnet removal, the detection window  $100 \mu\text{m}$  length and  $200 \mu\text{m}$  width was arbitrary placed with IRIS software at  $100 \mu\text{m}$  from physical restriction ending.

To further optimize this microdevice for nanoparticles trapping, the influence of the magnet size and its distance from the channel on MCSNPs trapping has been investigated.

We first evaluated the variation of  $B$ , measured by a gaussmeter, for each magnet according to the distance from the magnet pole (Fig. 6a). The magnet properties are described in the method and model section. As expected, the magnet geometry has an influence on  $B$ . Even if the magnetic volume is not conserved for all the magnets,  $B$  decreases with the distance from the magnet and the  $B$  value on the magnet pole surface increases with the magnet height. These results are illustrated by the highest  $B$  value obtained with magnets 1 and 3. This can be explained by the fact that for flat magnets (2 and 4), the distance covered by the magnetic field lines outside the magnet is important compared to the one covered inside the magnet thus decreasing the magnetic field line density. Moreover,  $B$  decreases much more quickly away from magnet 3 and 4 surface compared to magnet 1 and 2.

We have then investigated the effect of the magnet size and consequently of the applied  $B$  value on the amount of MCSNPs that could be trapped at a given distance from the magnet (0.5 cm from the channel) (Fig. 6b). The real  $B$  value within the magnetic chamber has not been experimentally determined, but it was assumed that increasing  $B$  at the external magnet surface leads to an increase in  $B$  value inside the magnetic chamber until a saturation as explained later. As expected, the capture capacity varies as a function of the magnet properties. The highest nanoparticle capture capacity was achieved with magnets 1 and 2.

Thereafter, a similar study was performed to evaluate the influence of the magnet distance from the channel on the capture capacity. The magnet producing the highest  $B$  value (magnet 1) has been used. Fig. 6c shows that beyond 1 cm, increasing the distance of magnet 1 from the magnetic chamber leads to a decrease in the MCSNPs capture capacity. Simulations (data not shown) underlined that for magnet 1 placed 0.5 cm from magnetic chamber, the magnetic field lines were parallel in the channel zone and  $B$  was homogeneous in channel depth ( $y$ -axis). One can expect that if the magnet distance increases, the magnetic field lines in the microchannel are not parallel anymore

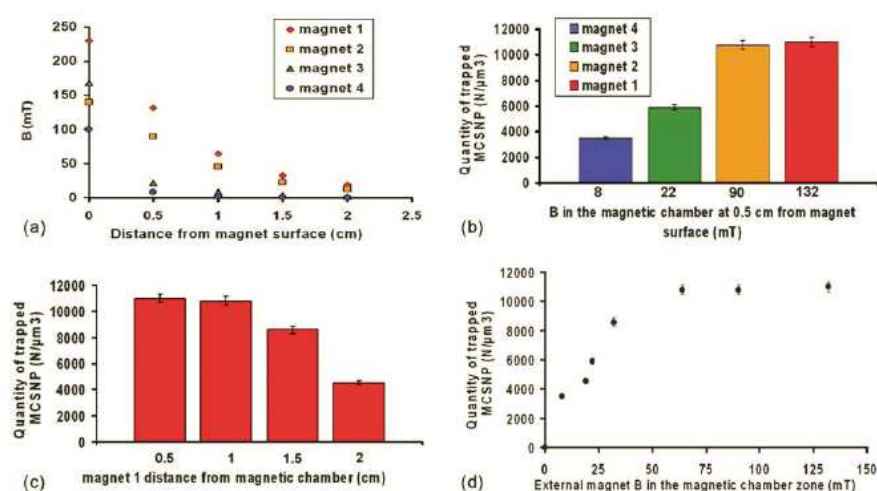


Fig. 6 (a) Evolution of  $B$  according to the distance from magnet surface using a gaussmeter. (b) Magnet influence on MCSNPs trapping efficiency at 0.5 cm from magnetic chamber. (c) Influence of magnet 1 distance from magnetic chamber on MCSNPs trapping efficiency. (d) Summary of trapped MCSNPs quantity variation as a function of external permanent magnet  $B$  in the magnetic chamber area.

and thus  $B$  becomes heterogeneous in the channel zone on the  $y$ -axis leading to a decrease of bead magnetization with the channel depth. Finally, both magnet shape and distance were varied in order to study directly the influence of  $B$  on the MCSNPs trapping. Fig. 6d presents the MCSNPs capture capacity according to the external magnet  $B$  value in the channel zone. The quantity of trapped MCSNPs increases with  $B$  until reaching a plateau. We identify that, in the present conditions, maximal MCSNPs trapping capacity will be obtained by applying an external  $B$  value of about 50 mT in the magnetic chamber. Maximal MCSNPs trapping capacity might be due to iron beads saturation magnetization which is the state reached when the increasing of external  $B$  has no more effect on material magnetization; all the spins of iron bead magnetic domains are aligned. Maximal trapping capacity could also be attributed to the saturation of MCSNP volume occupancy where  $F_{mag} > F_{drag}$ .

Finally, in order to perform high throughput analysis, the influence of flow rates on MCSNPs trapping kinetics has been studied using magnet 1 at 0.5 cm from the magnetic chamber

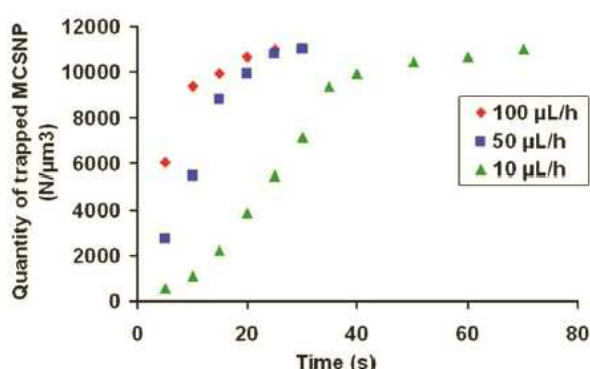


Fig. 7 Influence of flow rates on trapped MCSNPs occupancy in the magnetic chamber. The quantity of trapped MCSNPs was evaluated by measuring the surface of the fluorescent signal into the magnetic chamber using microscope imaging.

(Fig. 7). Three different flow rates have been investigated: 10, 50 and 100  $\mu\text{L h}^{-1}$ . The capacity of capture is not affected by the flow rate (data not shown) illustrating that the magnetic force generated is still higher than the drag force. As expected the higher the flow rate, the faster the capture capacity saturation is reached. Saturation of the magnetic plug was obtained after 15, 25 and 50 s using 100, 50 and 10  $\mu\text{L h}^{-1}$  flow rate respectively. No higher flow rate has been used to avoid clogging of the physical restriction.

## Conclusion

We have successfully developed a microdevice integrating a functional magnetic chamber consisting of packed micrometric iron beads dedicated to 30 nm magnetic nanoparticles trapping.

Due to the small size of the nanoparticles and their low content of magnetic material, high magnetic flux gradient is required to magnetically trap these nanometric objects. In this way, ferromagnetic micrometric beads were used to concentrate magnetic field lines produced by an external magnet and to locally increase  $B$  and therefore  $F_{mag}$ . Finite element numerical simulations have been carried out to help develop the device. They have shown the local increase in  $B$  and  $F_{mag}$  in the presence of iron beads as well as their distribution. The proof of concept of this microdevice to easily and efficiently trap and release fluorescent 30 nm colloidal MCSNPs was demonstrated. Furthermore, the influence of ferromagnetic bead nature and magnet on  $F_{mag}$  gain respectively as well as the flow rate on MCSNPs trapping kinetics was investigated. Due to their colloidal behaviour and their tuneable surface chemistry, future developments are in progress to combine nanoparticle advantages and their efficient trapping in this microdevice.

## Acknowledgements

This work was supported by the French research agency ANR SOLUDIAG ANR-07-BLAN-02660 and by a Swiss National

Science Foundation grant entitled "Supramolecular phases for protein adsorption" (Grant No 404740-117321). Thanks go to Dr Jacques Jossierand for his assistance in the numerical simulations.

## References

- 1 K. S. Kim and J. K. Park, *Lab Chip*, 2005, 5, 657–664.
- 2 J. W. Choi, K. W. Oh, J. H. Thomas, W. R. Heineman, H. B. Halsall, J. H. Nevin, A. J. Helmicki, H. T. Henderson and C. H. Ahn, *Lab Chip*, 2002, 2, 27–30.
- 3 S. Y. Yang, K. Y. Lien, K. J. Huang, H. Y. Lei and G. B. Lee, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24, 855–862.
- 4 J. Do and C. H. Ahn, *Lab Chip*, 2008, 8, 542–549.
- 5 M. A. M. Gijs, F. Lacharme and U. Lehmann, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 1518–1563.
- 6 N. Pamme, *Lab Chip*, 2006, 6, 24–38.
- 7 M. Slovakova, N. Minc, Z. Bilkova, C. Smadja, W. Faigle, C. Futterer, M. Taverna and J. L. Viovy, *Lab Chip*, 2005, 5, 935–942.
- 8 F. Lacharme, C. Vandevyver and M. A. M. Gijs, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 2905–2910.
- 9 S. Bronzeau and N. Pamme, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 609, 105–112.
- 10 A. Sinha, R. Ganguly and K. I. Puri, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, 321, 2251–2256.
- 11 M. A. Hayes, N. A. Polson, A. N. Phayre and A. A. Garcia, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5896–5902.
- 12 Z. H. Fan, S. Mangru, R. Granzow, P. Heaney, W. Ho, Q. Dong and P. R. Kumar, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 4851–4859.
- 13 L. Korecka, Z. Bilkova, M. Holeapek, J. Kralovsky, M. Benes, J. Lenfeld, N. Minc, R. Cecal, J. L. Viovy and M. Przybylski, *J. Chromatogr. B*, 2004, 808, 15–24.
- 14 M. Abonnenc, A.-L. Gassner, J. Morandini, J. Jossierand and H. H. Girault, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 395, 747–757.
- 15 T. Deng, M. Prentiss and G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.*, 2002, 80, 461–463.
- 16 M. Bu, T. B. Christensen, K. Smistrup, A. Wolff and M. F. Hansen, *Sens. Actuators A*, 2008, 145, 430–436.
- 17 K. Smistrup, O. Hansen, H. Bruus and M. F. Hansen, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, 293, 597–604.
- 18 E. Verpoorte, *Lab Chip*, 2003, 3, 60–68.
- 19 J. Won, M. Kim, Y. W. Yi, Y. H. Kim, N. Jung and T. K. Kim, *Science*, 2005, 309, 121–125.
- 20 B. H. Hui, Z. J. Tsao, J. J. Wang and F. Y. Yu, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 7029–7035.
- 21 C. H. Chiou, Y. Y. Huang, M. H. Chiang, H. H. Lee and G. B. Lee, *Nanotechnology*, 2006, 17, 1217–1224.
- 22 J. Dobson, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, 3, 139–143.
- 23 T. Rheinländer, R. Kötitz, W. Weitschies and W. Semmler, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2000, 219, 219–228.
- 24 M. Donolato, M. Gobbi, P. Vavassori, M. Leone, M. Cantoni, V. Metlushko, B. Ilic, M. Zhang, S. X. Wang and R. Bertacco, *Nanotechnology*, 2009, 20, 385501–385507.
- 25 T. B. Jones, *Electromechanics of particles*, 1995, Cambridge University Press.
- 26 J. C. McDonald and G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 491–499.
- 27 J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. K. Wu, O. J. A. Schueller and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2000, 21, 27–40.
- 28 R. Massart, J. C. Bacri, R. Perzynski and D. Salin, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1986, 62, 36–46.
- 29 N. Fauconnier, A. Bee, J. Roger and J. N. Pons, *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, 1996, 100, 212–216.
- 30 Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers and Y. Xia, *Nano Lett.*, 2002, 2, 183–186.
- 31 V. Maurice, T. Georgelin, M. J.-Siaugue and V. Cabuil, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, 321, 1408–1413.
- 32 T. Georgelin, V. Maurice, B. Malezieux, J.-M. Siaugue and V. Cabuil, *J. Nanopart. Res.*, 2010, 12, 675–680.
- 33 P. Campbell, *Permanent Magnet Materials and their Application*, ed. Cambridge University Press, 1996, pp 7–8.
- 34 G. P. Hatch and R. E. Stelter, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2001, 225, 262–276.
- 35 J. Liu, E. M. Lawrence, A. Wu, M. L. Ivey, G. A. Flores, K. Javier, J. Bibette and J. Richard, *Phys. Rev. Lett.*, 1995, 74, 2828–2831.
- 36 P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud and J.-L. Viovy, *Science*, 2002, 295, 2237.
- 37 A.-L. Gassner, M. Abonnenc, H. X. Chen, J. Morandini, J. Jossierand, J. S. Rossier, J.-M. Busnel and H. H. Girault, *Lab Chip*, 2009, 9, 2356–2363.

## Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

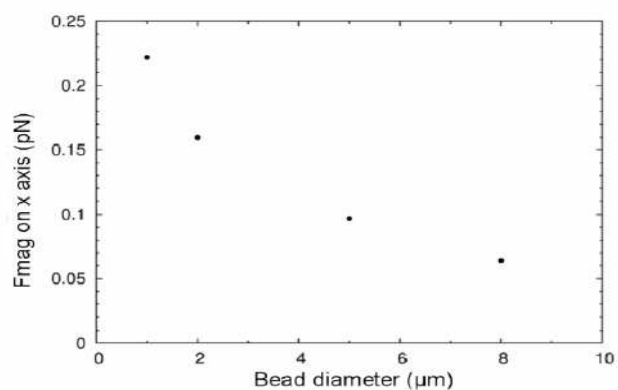


Figure S1: Evolution of  $F_{mag}$  on the x-axis in the magnetic chamber according to the iron beads diameter according numerical simulations using two square magnets (100 μm) in attraction with remnant  $B$  of 1T in the magnet.

Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

### SI 1: Finite element formulation of the magnetic field

The integral formulation is based on the local form given by Eq (1) from the paper using the scalar potential  $\phi$  :

$$\text{div}\mathbf{B} = \nabla \cdot (-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0) = 0 \quad (\text{S1})$$

Equation (S1) is derived in the global form (S2), using the Galerkin formulation frequently used in the finite element method (multiplication by a projective function  $\alpha$  and integration on the domain of study).

$$\iint [\alpha \nabla \cdot (-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0)] d\omega = 0 \quad (\text{S2})$$

By decomposing the product between  $\alpha$  and the divergence in (S2), the second order derivative of the unknown  $\phi$  (divergence of  $\nabla\phi$ ) becomes:

$$\alpha \nabla \cdot (-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0) = \nabla \cdot [\alpha(-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0)] - \nabla\alpha \cdot (-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0) \quad (\text{S3})$$

Equation (S3) is applied in (S2) and the Ostrogradsky theorem is used to reject the divergence term  $\nabla \cdot [\alpha(-\mu\nabla\phi + \mathbf{B}_0)]$  at the boundary in (S4) where it equals to zero (no magnetic field at the external boundaries of the domain due to the use of a large "air box").

$$\iint [\nabla\alpha \cdot (\mu\nabla\phi - \mathbf{B}_0)] d\omega + \int \alpha \mathbf{B} \cdot \mathbf{n} d\omega = 0 \quad (\text{S4})$$



Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

The unknown vector  $\phi$  is interpolated with a function  $\beta$  of the same type as the projective function  $\alpha$  as the Galerkin method is used. It leads to the final form (S5) where the first term corresponds to the matrix to invert, the second term being the source term (discretization non described).

$$\iint \mu \nabla \alpha \cdot \nabla \beta \phi \, d\omega = \iint \nabla \alpha \cdot \mathbf{B}_\theta \, d\omega \quad (\text{S5})$$

Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

**SI 2: Numerical model and assumptions**

Numerical simulations, based on the finite elements method (FEM), were carried out in 2D geometries with the commercial software Flux-Expert™ (Astek Rhône-Alpes) on a Mac Pro with Ubuntu Linux 7.10 operating system.

In the case of permanent magnets and in the absence of charges in movement, the magnetic field  $\mathbf{H}$  is irrotational and as the calculation domain is simply connected,  $\mathbf{H}$  derives from a scalar magnetic potential  $\phi$  ( $\mathbf{H} = -\nabla\phi$ ). As the magnetic flux density  $\mathbf{B}$  is conservative, the equation to be solved using a Galerkin formulation (Supporting information, SI 1) is written as:

$$\operatorname{div} \mathbf{B} = \nabla \cdot (-\mu \nabla \phi + \mathbf{B}_0) = 0 \quad (4)$$

Where  $\mathbf{B}_0$  represents the magnetic flux density imposed in the magnet and  $\mu$  the permeability. The magnetic force acting on a magnetic dipole moment  $\mathbf{m}$  can be expressed as the gradient of the magnetic potential energy  $U$ . If we assume  $\mathbf{m}$  constant, this force is simply given by:

$$\mathbf{F}_m = -\nabla(U) = \nabla(\mathbf{m} \cdot \mathbf{B}) = (\nabla \mathbf{m}) \cdot \mathbf{B} + \mathbf{m} \cdot \nabla \mathbf{B} \approx (\mathbf{m} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (5)$$

Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

In the case of superparamagnetic nanoparticles in a non-magnetic medium like pure water, the magnetic dipole moment can be written as  $m = VM = V\chi H$ . As  $H$  and  $B$  only differ by the constant  $\mu_0$ , the magnetic force can finally be written as Eq.

The following assumptions are made: (a) magnetostatic conditions ( $\partial B/\partial t=0$  and no external source of electric or magnetic field), (b) homogeneous media ( $\mu$  uniform in every domain), (c) air box big enough for not perturbing the magnetic field distribution, (d) constant magnetic susceptibility of the particles and magnetic moment assumed to be unsaturated, (e) static particle solution in the microchannel (no flow), (f) particles have no influence on the magnetic field and (g) interactions between particles are not considered.

### SI 3: Numerical parameters

The magnetic flux density and force were calculated in a 2D geometry for a reference system. It is composed of a microchannel (30  $\mu\text{m}$  high and 100  $\mu\text{m}$  long) closed by insulating layers (35  $\mu\text{m}$  high and 100  $\mu\text{m}$  long), surrounded by two permanent square micromagnets (100  $\mu\text{m}$ ), providing a spacing of 100  $\mu\text{m}$  between the two magnets. The whole reference system is placed in an air box, enabling the magnetic field to rotate freely from one pole to the other. The total proportions of the system are a length of 600  $\mu\text{m}$  for a height of 800  $\mu\text{m}$ . One (or more) column composed of 12 ferromagnetic beads spaced by 0.1  $\mu\text{m}$  is placed vertically in the middle of the microchannel. The mesh size ( $\delta$ ) was chosen according to the criteria previously validated,<sup>1</sup> that is to say less than 1/20 of the channel height in the microchannel and less than 1/20 of the magnet length for the edges of the magnets. For the ferromagnetic beads,  $\delta = 0.2 \mu\text{m}$  (1/10 of bead diameter).

The numerical parameters are:

Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

$$\mu_0 = 1.256 \times 10^{-6} \text{ [H/m]}$$

$$B_0 \text{ (perpendicular to the microchannel)} = 1 \text{ [T]}$$

$$\text{Magnetic susceptibility of nanoparticles } \chi_{nano} = 0.01 \text{ [-]}$$

$$\text{Magnetic susceptibility of iron beads } \chi_{ferro} = 3.9 \text{ [-]}$$

$$\text{Magnetic susceptibility of polystyrene magnetic beads } \chi_{poly} = 1 \text{ [-]}$$

$$\text{Nanoparticles diameter } d_{nano} = 30 \text{ [nm]}$$

$$\text{Iron beads diameter } d_{ferro} = 2 \text{ [}\mu\text{m]}$$

$$\text{Polystyrene magnetic beads diameter } d_{poly} = 2 \text{ [}\mu\text{m]}$$

## References

- 1 A-L. Gassner, M. Abonnenc, H. X. Chen, J. Morandini, J. Josserand, J. S. Rossier, J-M. Busnel and H. H. Girault, *Lab Chip*, 2009, **9**, 2356–2363.

### **III°) Développement d'un microsysteme bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie**

#### III.1°) Préambule et résultats préliminaires

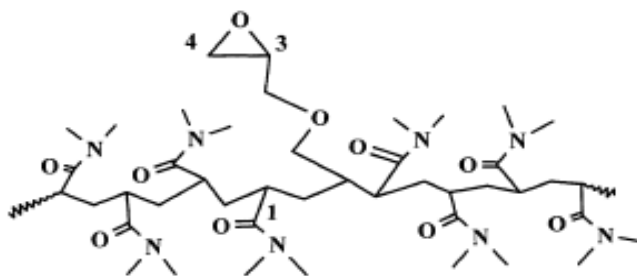
Comme nous l'avons vu dans l'article précédent, une chambre magnétique a été développée au sein d'un microsysteme afin de confiner magnétiquement les NPCC. Cette chambre a été développée dans l'optique de pouvoir à la fois séparer le complexe des formes libres et préconcentrer la cible avant sa détection, deux étapes essentielles de la procédure analytique. Ainsi, un immunoessai indirect non compétitif a été mis en œuvre au sein d'un microsysteme dans l'optique d'exploiter les propriétés colloïdales des nanoparticules ainsi que les forts gradients de champ magnétique générés au sein de la chambre magnétique. La première étape de l'immunoessai consiste à capturer la cible en phase colloïdale au sein du microcanal. Après cette capture les NPCC et donc la cible seront confinées et préconcentrées au sein de la chambre magnétique avant de réagir avec l'Ac de détection (fluorescent), la détection fluorescente s'effectuant au sein de la chambre magnétique.

Cette détection pouvait s'effectuer selon différentes approches : l'Ac de détection est détecté au sein de la chambre magnétique, les NPCC sont relarguées de la chambre magnétique en supprimant le champ extérieur ou bien l'Ac secondaire peut être élué en "cassant" les interactions Ag/Ac. Le relarguage des NPCC greffées de l'Ag et ayant réagi avec les Ac s'est avéré difficile car à pH 7 il y a formation d'agrégats au sein de la chambre magnétique, les NPCC sont alors retenues mécaniquement. En ce qui concerne l'éluion de l'Ac de détection, nous avons montré que même à des pH acides (pH de 1) une partie de l'Ac n'était pas élue, ce qui peut poser des problèmes en termes de quantification et de reproductibilité. Ces phénomènes seront discutés dans le chapitre conclusion et perspectives. Dans notre étude, l'étape de détection s'est donc effectuée au sein de la chambre magnétique.

Au cours de cette étude, afin d'évaluer le potentiel de ce microsysteme, nous avons évalué l'influence de différents paramètres tels que la concentration en NPCC, le temps d'incubation et le format de l'interaction (en phase colloïdale ou hétérogène). Enfin, afin de valider ce microsysteme en tant qu'outil de diagnostic de l'allergie, la quantification d'IgE provenant de patients allergiques au lait a été menée en parallèle au sein du microcanal et d'une microplaque.

Le microsysteme que nous avons développé a été microfabriqué en utilisant le PDMS et ce pour des raisons de coût et de simplicité. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 1, l'adsorption des macromolécules comme les protéines sur les parois de PDMS peut être critique

pour de tels rapports surface sur volume. Nous avons ainsi effectué une étude sur l'influence du traitement de surface du PDMS. Pour cela nous avons utilisé un traitement rapide et simple à mettre en œuvre à l'aide d'un polymère hydrophile et neutre développé et donné par le Pr. M. Chiari (CNR Italie) : le PDMA-AGE (polydiméthylacrylamide-co-allylglycidyl ether). Le PDMA-AGE est un polymère de la famille des polyacrylamides, synthétisé à l'origine pour le traitement de capillaires (Figure 5) [1]. En effet, la présence du groupement époxyde sur l'acrylamide permet de renforcer les liaisons hydrogènes entre le PDMS et le PDMA-AGE par rapport à un polyacrylamide classique. Ce traitement permet d'une part de rendre le flux électroosmotique quasi nul et d'autre part de limiter l'adsorption non spécifique des protéines, comme nous l'avons montré dans de précédentes études [2]. Le protocole de ce traitement de surface est décrit en annexe 6.



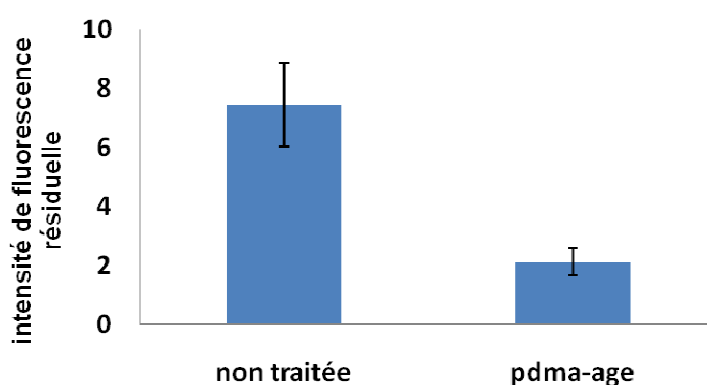
**Figure 5. Formule du PDMA-AGE**

Dans un premier temps, des mesures par spectroscopie Infra Rouge (Infrarouge à Transformée de Fourier) du PDMS non traité et du PDMS traité ont permis de confirmer la présence de PDMA-AGE sur le PDMS (spectres en annexe 7). On observe bien une bande d'absorbance à  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux  $\nu_{\text{C=O}}$  des amides et une bande à  $1400\text{ cm}^{-1}$  correspondant au  $\nu_{\text{C-O}}$  des liaisons éthers.

Suite au traitement de surface, l'adsorption non spécifique des différents partenaires de la réaction immunologique à la surface du PDMS a été caractérisée par mesure de fluorescence résiduelle [3]. Cette méthode permet de comparer l'adsorption non spécifique d'une espèce donnée sur différentes surfaces. Le principe consiste à injecter une solution du composé d'intérêt fluorescent dans le canal. On effectue alors un rinçage avec un électrolyte choisi et on mesure l'intensité de fluorescence en fonction du temps de rinçage.

Tout d'abord, l'adsorption des NPCC non fonctionnalisées (sans Ag) a été évaluée. Pour cela nous avons utilisé des NPCC fluorescentes. Ces mesures de fluorescence résiduelle ont été effectuées à débit non nul afin de se placer dans les conditions les plus critiques. En effet, il a été montré qu'à

débit nul, un phénomène de déplétion apparaît assez rapidement sur une zone donnée du canal [4]; l'adsorption est donc plus forte lorsque la solution est percolée à débit faible. La mesure de la fluorescence résiduelle à la surface du PDMS rend compte de l'adsorption non spécifique des nanoparticules. Ces résultats montrent l'efficacité du PDMA-AGE pour limiter l'adsorption non spécifique des NPCC non greffées. A pH 7 les groupements amines étant sous forme  $\text{NH}_3^+$ , il était attendu que les NPCC non greffées s'adsorbent sur le PDMS après son passage au plasma  $\text{O}_2$  (effectué pour le collage des microsystemes). En effet, les NPCC sont globalement chargées positivement à pH 7, la surface du canal est chargée négativement à cause de la présence de groupements  $\text{SiO}^-$  en surface. Il en résulte des interactions électrostatiques entre le PDMS et les NPCC non greffées. Ces interactions sont limitées après traitement au PDMA-AGE (Figure 6) qui permet de recouvrir les charges négatives de surface.



**Figure 6. Fluorescence résiduelle provenant des NPCC avant et après traitement du PDMS au PDMA-AGE.** Les NPCC ( $5 \times 10^{15}$  NPCC/mL) dans PBS-tween 0,1%(v/v) sont percolées à  $20 \mu\text{L/h}$  et rinçage au PBS-tween 0,1%(v/v) à  $20 \mu\text{L/h}$  ( $n=2$ ).

Par la suite, nous avons effectué la même expérience mais avec des NPCC greffées avec l'Ag. La valeur de la fluorescence résiduelle mesurée après rinçage est de l'ordre de grandeur du bruit de fond avec ou sans traitement au PDMA-AGE. Cette diminution de l'adsorption non spécifique s'explique par le fait que le greffage de l'Ag à la surface des NPCC modifie la charge de surface de ces dernières en réduisant le nombre de  $\text{NH}_3^+$  accessibles, de plus à pH 7,5 l'Ag est globalement chargé négativement.



Suite à cette étude, l'adsorption de l'Ac de détection fluorescent, utilisé pour l'immunoessai en microsysteme, a été évaluée. Comme précédemment, aucune adsorption significative sur les parois du microsysteme n'a été observée, la fluorescence résiduelle était de l'ordre de grandeur du bruit de fond dans les deux cas de figure.

Enfin, l'ensemble de l'immunoessai décrit dans l'article suivant a été effectué avec ou sans traitement préalable au PDMA-AGE du microsysteme, le coefficient de variation des résultats concernant le dosage des Ac cibles est inférieur à 2,5% pour des concentrations comprises entre 3 et 30 ng/mL en Ac cible. Ainsi, dans notre cas d'étude, l'adsorption non spécifique des différents partenaires de l'immunoessai n'est pas significative et un traitement de surface n'est alors pas indispensable. Par ailleurs, le traitement au PDMA-AGE au sein du microsysteme présentant une restriction physique a généré dans certains cas des problèmes de bouchage et de fuites, cela pouvant être dû à la formation de plusieurs couches de polymères au niveau des tunnels qui entraîneraient une augmentation de la résistance hydrodynamique. Notons néanmoins que le traitement de surface doit être étudié pour chacun des couples support/molécule cible utilisés

III. 2°) Article 4

## Micro Total Analysis System Integrating Magnetic Nanoparticles for Allergy Diagnosis

*Article en rédaction*

### Introduction

Since the discovery of immunoglobulin E (IgE) and its key role in allergic reactions,<sup>[1]</sup> there has been a growing interest in developing analytical methods dedicated to IgE quantification. In clinical research, the *in vitro* allergy diagnosis is based on the IgE quantitation from patient sera using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a microtiter plate (MP) or with commercial Immunocap from Phadia. Even if solid surface used as immunosupport allows target preconcentration and easy washing steps, these heterogeneous immunoassays remain laborious, time consuming (from hours to days) and require large volumes of sample and reagents. There have been numerous attempts to overcome these limitations, recently the Whiteside's group has developed a paper-based ELISA combining low cost, small volumes consumption and ease-of-use but this approach suffers from poor sensitivity.<sup>[2]</sup> Besides many groups have demonstrated the potential of microfluidics for immunoassays development.<sup>[3]</sup> In particular, the combination of microdevices and micrometric beads led to (i) the integration of the lab process, (ii) handling low volume, (iii) increasing the surface to volume ratio (S/V) while decreasing diffusion distances. Nevertheless despite these advantages, the immune reactions are still performed in heterogeneous format as in many cases the micrometric beads are physically packed or magnetically trapped, their surfaces are thus not totally exploited. Some groups have overcome the limitations related to the micrometric beads sedimentation by performing analysis in continuous flow<sup>[4]</sup> or using sophisticated fluidic handling and mixing step.<sup>[5]</sup> Lately, nanowires developed for multiplexing<sup>[6]</sup> and colloidal nanoparticles appeared as an interesting immunosupport for bioassays since they offer much higher S/V. The latter were mainly developed for agglutination assay,<sup>[7]</sup> while the detection, which is based on turbidity or scattering measurement, was performed off chip as the integration of such measurement devices is complicated and requires specific materials.<sup>[8]</sup>

Herein we show a micro total analysis system ( $\mu$ TAS) dedicated to allergy diagnosis that combines both advantages of homogeneous and heterogeneous immunoassays in particular the diffusion of immunological partners and an increase of S/V that improves analyte mass transfer as well as the integration of a preconcentration step. To do so, magnetic core-shell nanoparticles (MCSNPs) have been designed<sup>[9]</sup> and characterized<sup>[10]</sup> in order to be used as immunosupport in a  $\mu$ TAS that integrates the whole immunoassay procedure : incubation, preconcentration and detection steps.

## Materials and Methods

### Microsystem fabrication and set up

The microdevice was fabricated in two main steps : master fabrication and replica moulding. Master fabrication was performed using the standard multilayer soft lithography method.<sup>[11,12]</sup> The microstructures (channel and restriction) were designed in a computer aided design (CAD) program. Transparencies of the CAD-generated patterns were then created using commercial services. The first layer was obtained by spin coating the negative SU-8 2002 photoresist (Microchem, viscosity 7.5cSt) at 2000 rpm. The manufacturer predicts a layer height of 2.4  $\mu$ m. The restriction design was insulated (435 nm, 7s) onto the wafer and then developed. We measured the height of the restriction with a stylus profiler Dektak4M (Veeco). The measured restriction height (3 $\mu$ m) was in good agreement with the photoresist manufacturer prediction. On the same wafer we spin coat the second layer. We used the negative SU-8 2015 photoresist (Microchem, viscosity 1250cSt) at 1500 rpm. The channel design was then aligned, with a mask aligner MJB4 (SUSS MicroTec), onto the restrictions and then insulated (435 nm, 10s). The wafer was developed and the height measured. The second layer height is approximately 30  $\mu$ m. The polydimethylsiloxane Sylgard 184 elastomer (PDMS, Dow Corning) was poured and further cured on a SU-8 mold (Microchem). Holes were punched for the inlets and the PDMS replicates were sealed to glass slides following oxygen plasma treatment at 200 mTorr for 30 s using plasma cleaner (Harrick scientific).

Spherical iron beads (7 $\pm$ 0.6  $\mu$ m, Good Fellow) offering a saturation magnetization of about 1.1 $\times$ 10<sup>6</sup> A/m were used for the magnetic chamber development. The iron beads were magnetized with a permanent magnet (Chen Yang, 2 cm diameter and 1 cm high) presenting a magnetic remanence of 1.3 T. The formation of the magnetic beads plug was performed under a sufficient flow rate in order to avoid the iron beads sedimentation. The samples were injected using syringes

of different volumes. The latter were connected to the microsystem inlet by a capillary tube. The flow rate was controlled by a syringe pump (Kd scientific).

Microchip analyses were monitored by an IX-71 inverted fluorescence microscopic system (Olympus) equipped with spectral filters, 460–490 nm and a 100 W mercury lamp (Olympus). A CCD camera 1388×1038 pixels Pike (RD Vision) was mounted on the microscope and Hiris software (RD Vision) was used for camera control and image processing.

### **Magnetic core shell nanoparticles synthesis**

MCSNPs synthesis has been previously reported.<sup>[13]</sup> Briefly, maghemite nanoparticles (mean physical diameter 7 nm) were prepared by co-precipitation of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions under alkaline conditions. Nanoparticles were coated by citrate anions and dispersed in water. These maghemite nanoparticles were encapsulated in silica shells prepared by condensation of tetraethoxyorthosilicate (TEOS, Sigma), in ethanolic medium in the presence of ammonia as catalyst. The silica shell functionalization was carried out by simultaneous condensation of a silica amine-derived compound (APTS, Sigma) and a silica polyethyleneglycol (PEG)-derived compound (PEOS, Gelest). The concurrent addition of a small amount of TEOS resulted in the formation of a cross-linked silica shell. The particle surface chemistry can be tuned by varying the PEOS to APTS molar ratio, the amount of PEOS remaining constant while the quantity of APTS increases. The ratio used here was a 3:1 PEOS/APTS ratio. The reaction of silica condensation was carried out overnight and the particle suspension was destabilized with diethyl ether. A red pellet was formed and separated by magnetic settling. The pellet was washed twice with a mixture of diethyl ether and ethanol (15:1) and redispersed in 10 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS, Sigma) buffer (pH 7.5). This colloidal solution of amino-PEG functionalized MCSNPs (approximately  $3.3 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup>) was stable for months.

### **Grafting of $\alpha$ -lactalbumin antigen on magnetic core shell nanoparticles.**

The optimization of  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -lac, Sigma) antigen grafting via a chemometric approach was previously reported.<sup>[14]</sup> Briefly 350  $\mu$ L of MCSNPs solution ( $3.3 \times 10^{14}$  MCSNPs mL<sup>-1</sup>) were mixed with 200  $\mu$ L of N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma) at 0.42 mg mL<sup>-1</sup>, 200  $\mu$ L of N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS, Sigma) at 0.80 mg mL<sup>-1</sup> and 400  $\mu$ L of  $\alpha$ -lac solution (1 mg mL<sup>-1</sup>, Sigma) in a 2 mL Eppendorf tube. Each reagent solution

was freshly prepared in 10 mM MOPS buffer at pH 7.5. All tubes were gently shaken at 20°C for 15 h. The MCSNPs grafted with  $\alpha$ -lac (MCSNPs-Ag) were rinsed 3 times with 400  $\mu$ L of 10 mM MOPS buffer using centrifugation (15,000g/5 min) or a MACS separator column (Miltenyi). Finally, MCSNPs-Ag were solubilized in 400  $\mu$ L of 150 mM phosphate buffer salt (PBS)-Tween 0.1% (v/v) using ultrasonic wave for 30 s to facilitate MCSNPs solubilization and prevent any cluster formation.

### Immunoassay procedure using the microtiter plate

Microplate with 96 wells (Nunc) were coated with 100  $\mu$ L of a 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -lac solution prepared in 10 mM MOPS buffer for 15 h at 4°C. Each well was emptied and 200  $\mu$ L of 150 mM PBS-Tween (0.1% v/v, Sigma) containing Polyvinylpyrrolidone (1% w/v, Sigma) were used as blocking agent (2 h incubation). Then, 100  $\mu$ L of Goat anti-  $\alpha$ -lac IgG (target AbI, GeneTex<sup>®</sup>) solution prepared in 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) at various concentrations (0.1 to 10,000 ng mL<sup>-1</sup>) were added to each well (2 h incubation). 200  $\mu$ L of 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) were used 3 times for the washing step. Then, 100  $\mu$ L of 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> AlexaFluor488 labeled anti-target IgG (AbII\*, GeneTex<sup>®</sup>) prepared in 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) were added. After 1 h incubation, the plate was washed 3 times to remove unbound antibodies and detection was performed exciting AbII\* at 488 nm and fluorescent emission was read at 520 nm.

IgE determination in serum was carried out by adding 100  $\mu$ L of 5 times diluted serum from cow's milk allergic patient (3h incubation) in a microplate well previously coated with  $\alpha$ -lac. After washing step, 100  $\mu$ L of alkaline phosphatase labeled anti-human IgE antibody (anti-IgE-AP, Sigma) at 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> was then added for 2 h incubation. Finally 100  $\mu$ L of p-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma) substrate at 1 mg mL<sup>-1</sup> were added for 30 min after rinsing step. Colored product was measured at 405 nm.

### Immunoassay using the $\mu$ TAS

The immunoassay in the  $\mu$ TAS was performed through two different approaches. In the first one target AbI capture occurred in colloidal phase and AbII\* interaction occurred in heterogeneous phase within the magnetic chamber (1<sup>st</sup> approach). In the second approach both target AbI and AbII\* interact successively in heterogeneous phase with immobilized and confined MCSNPs within the magnetic chamber (2<sup>nd</sup> approach).

In the 1<sup>st</sup> approach, 100  $\mu\text{L}$  of MCSNPs-Ag ( $1.6 \times 10^{11}$  MCSNP  $\text{mL}^{-1}$  final concentration) were mixed with 50  $\mu\text{L}$  of target AbI (various concentrations) then injected in the microchannel where immune reaction was performed in stop flow. After 5 min incubation, permanent magnet (200 mT on its surface) was put at 0.5 cm from the top of the channel and a flow rate of 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  was applied for 10 min (for a magnetic plug of 300  $\mu\text{m}$  long, 200  $\mu\text{m}$  width and 30  $\mu\text{m}$  high) to magnetically trap and concentrate MCSNPs in the magnetic chamber. The microchannel was washed 2 min with 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) at a flow rate of 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AbII\* were injected at 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  for 5 min. After 2 min washing, detection was performed by exciting AbII\* at 488 nm and measuring fluorescent emission at 520 nm on a magnetic chamber surface of  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ .

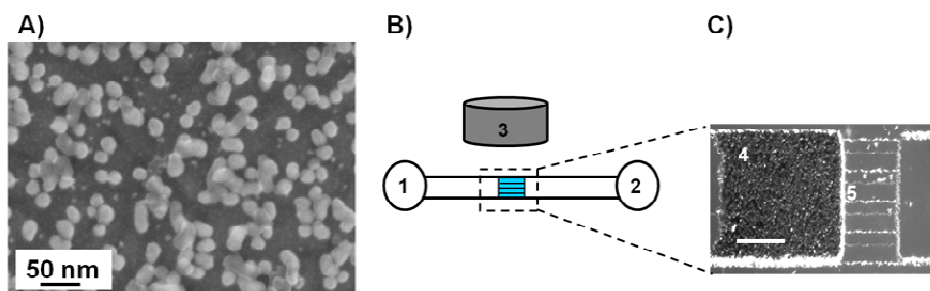
In the 2<sup>nd</sup> approach, the magnetic chamber was saturated with MCSNPs in the presence of the external magnet and the target AbI was injected at various concentrations for 5 min at 30  $\mu\text{L h}^{-1}$ . The microchannel was washed 2 min with 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) at a flow rate of 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AbII\* were injected at 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  for 5 min. The detection was performed as previously mentioned.

IgE determination was performed using the 1<sup>st</sup> approach : 20  $\mu\text{L}$  of serum were mixed with 80  $\mu\text{L}$  of MCSNPs-Ag ( $6.7 \times 10^{11}$  MCSNPs  $\text{mL}^{-1}$  final concentration) and injected in the microchannel. After 5 min incubation in stop flow, the permanent magnet was put on the top of the microdevice and a flow rate of 30  $\mu\text{L h}^{-1}$  was applied for 10 min. After 2 min washing with 150 mM PBS-Tween (0.1% w/v) 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of FITC labeled anti-human IgE (anti-IgE-FITC, GeneTex<sup>®</sup>) were injected for 5 min at 30  $\mu\text{L h}^{-1}$ . After rinsing, anti-IgE-FITC were detected as described above.

## Results

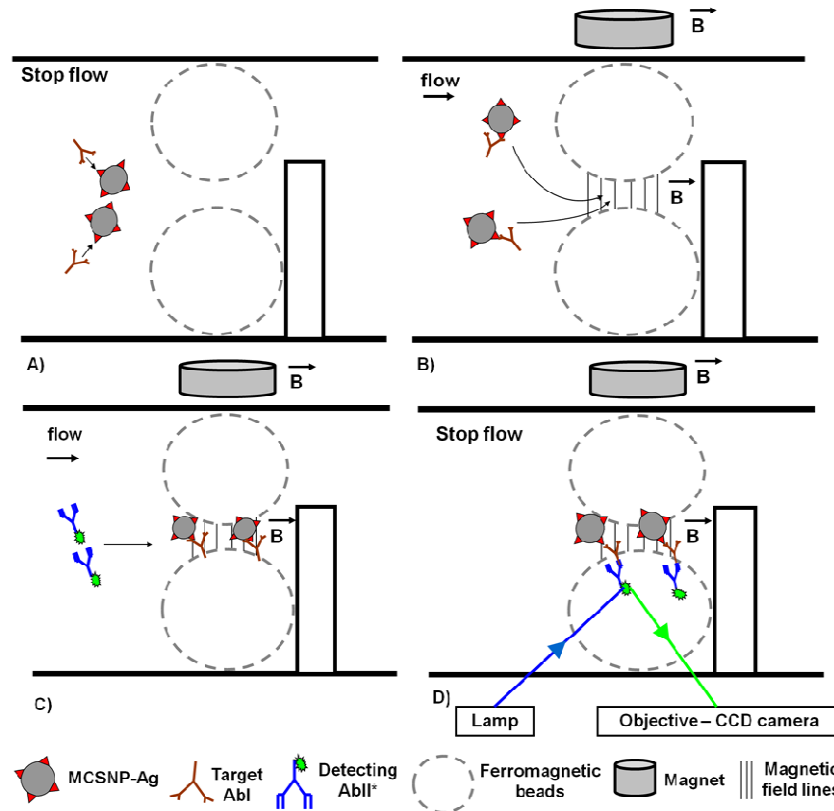
The choice of MCSNPs as immunosupport was mainly motivated by their colloidal behavior and Brownian motion which enhance liquid stirring and favor molecules diffusivity.<sup>[15]</sup> The MCSNPs (physical diameter of 35 nm) used in this work were made of a magnetic core encapsulated in a silica shell (Figure 1A). Recently, their potential for drug delivery has been evidenced.<sup>[16]</sup> The MCSNPs surface chemistry can be tuned easily as a function of the analytical requirements. In this case, their surface was functionalized with amino moieties to immobilize biomolecules and polyethylene glycol groups to prevent non-specific interactions from interfering molecules. Due to their colloidal behavior, the MCSNPs remain in suspension for months without sedimenting. However, because of their low relative magnetic weight (9.5%) and their low volume, the magnetic

gradient generated by a single magnet is not sufficient to trap these MCSNPs. In order to handle such MCSNPs, we have recently developed an original microdevice integrating a high magnetic gradient chamber (Figure 1B, C) consisting in ferromagnetic iron beads packed by a physical restriction.<sup>[17]</sup> When an external permanent magnet is placed on the top of the microdevice, the magnetic field lines are concentrated through the iron beads thus locally increasing the magnetic force and allowing a simple and efficient MCSNPs trapping into the magnetic chamber.



**Figure 1.** A) Scanning electron microscopy of MCSNPs (magnitude 250 000 ×). Non-encapsulated silica nuclei were observed. B)  $\mu$ TAS made of a single channel of 1.5 cm long, 200  $\mu$ m width and 30  $\mu$ m height with a permanent magnet on the top of the channel. 1 : inlet, 2 : outlet, 3 : external permanent magnet. C) Top picture of the magnetic chamber observed with photonic microscopy, scale bar : 100  $\mu$ m (magnitude 100 ×) 4 : ferromagnetic iron beads; 5 : physical restriction made of tunnels of 25  $\mu$ m width and 3  $\mu$ m height.

In this work we combined the benefit of such magnetic trapping with the colloidal behavior of functionalized MCSNPs to perform an immunoassay. The  $\mu$ TAS potential was first demonstrated with  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -lac) as antigen (Ag) and anti- $\alpha$ -lac IgG as model target antibody (AbI). The Ag were grafted on MCSNPs surface (18 Ag/MCSNP) in order to be used as capture immunosupport.<sup>[18]</sup> As sketched in Figure 2 the first interaction, which results in the capture of AbI on the nanosupport to form MCSNPs-Ag-AbI, takes place in colloidal suspension within the  $\mu$ TAS. The MCSNPs are then trapped and preconcentrated into the magnetic chamber. The detection of AbI is then revealed, in the heterogeneous MCSNPs packed assembly confined in the magnetic chamber, from a second interaction between AbI and a fluorescent-labelled antibody (AbII\*). We evaluated the relevance of such a microfluidic approach compared to more conventional ones, in terms of kinetics and sensitivity.

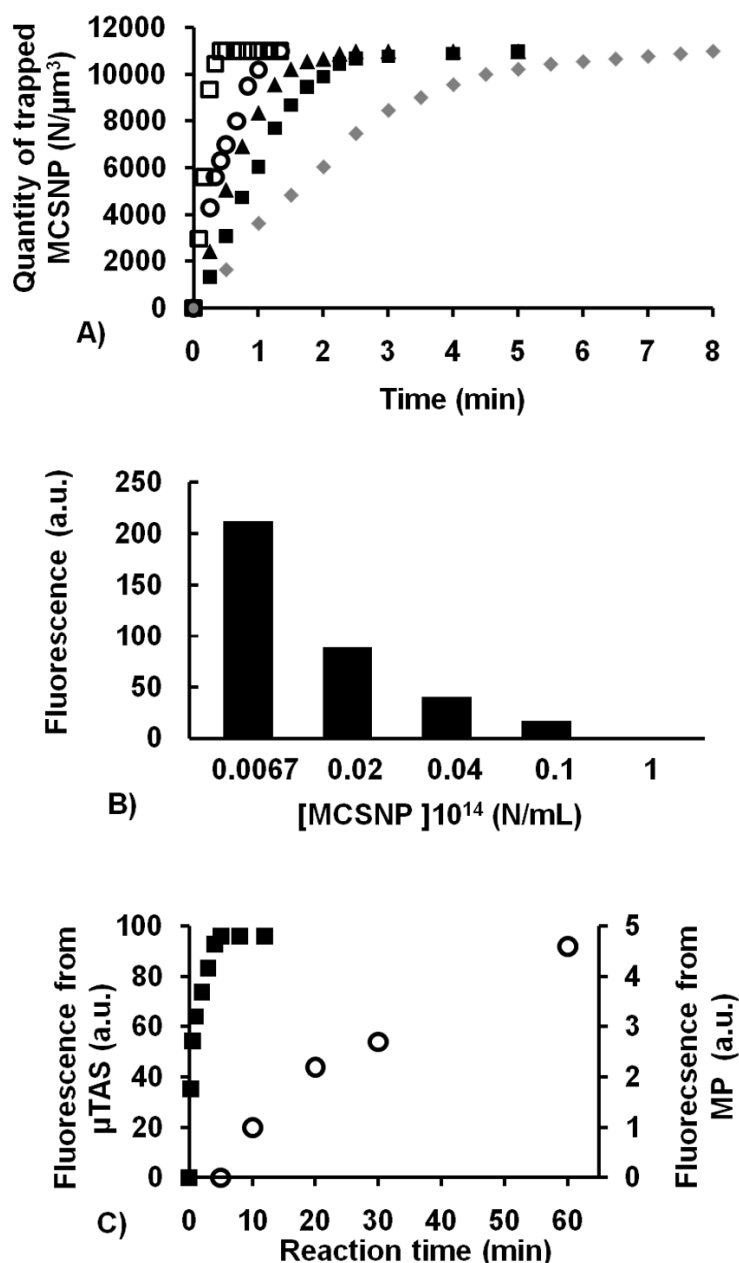


**Figure 2.** Principle of the MCSNPs based immunoassay in the  $\mu$ TAS. A) Capture of the target AbI in colloidal phase and stop flow using MCSNPs-Ag as immunosupport. B) Application of external permanent magnet (200 mT on its surface) on the top of the microdevice with a flow rate of  $30 \mu\text{L h}^{-1}$ . MCSNPs are magnetically trapped and concentrated in the magnetic chamber. C) AbII\* was injected at a flow rate of  $30 \mu\text{L h}^{-1}$  and interact with the pre-concentrated target AbI in heterogeneous phase within the magnetic chamber. D) AbII\* was excited with mercury lamp and fluorescent signal was collected by CCD camera monitored to an inverted microscope and treated with Hiris software. The fluorescence was measured in the central area ( $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ ) of the magnetic chamber.

To achieve a high sensitivity, we first evaluated the pre-concentration capacity of the magnetic chamber. Using such a magnetic trap, the amount of confined MCSNPs reached a maximum due to the magnetic chamber saturation and has been termed capture capacity. Figure 3A illustrates that whatever the MCSNPs concentration (from  $6.6 \times 10^{11}$  to  $1 \times 10^{14}$  MCSNPs  $\text{mL}^{-1}$ ), it was possible to confine the same maximal amount of MCSNPs. This capture capacity has been evaluated at  $2.2 \times 10^{16}$  MCSNPs  $\text{cm}^{-3}$ . It was expected that for a given flow rate, the higher the MCSNPs concentration, the faster the magnetic chamber saturation was reached. With the lowest MCSNPs concentration a pre-concentration factor of 35000 was reached. On the other hand, the optimization of the AbI detection relies mainly on the optimization of the AbI capture by the colloidal MCSNPs-Ag suspension during the incubation step since only a fraction (from 0.05 to 7.5%) of the total



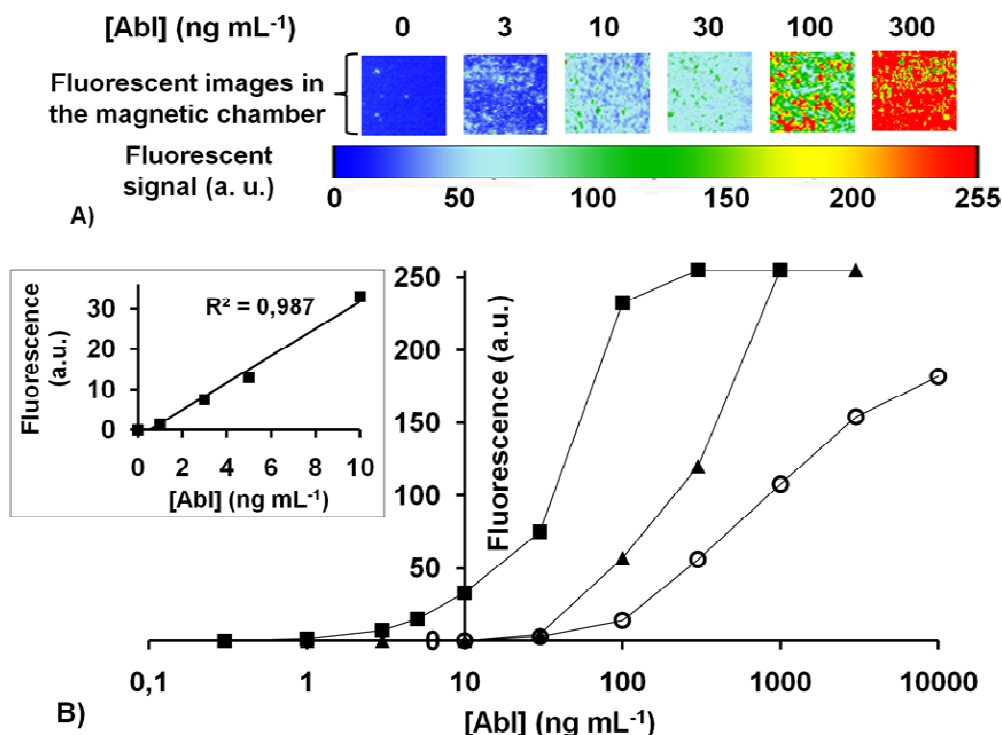
amount of MCSNPs was finally trapped in the magnetic chamber. The MCSNP-Ag/AbI interaction kinetic in colloidal phase has been already studied.<sup>[19]</sup> We have demonstrated the advantage of using nano-immunosupport compared to micro and millimetric ones in batch experiments as the decrease of the immunosupport dimension fastens the AbI capture kinetics. The capture of AbI by colloidal suspension of MCSNP-Ag was described by an adsorption-like kinetic process with an apparent first-order rate constant  $k_{app} \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . It was then expected that within < 10 min of incubation the equilibrium capture has been reached and the amount of AbI bound to MCSNPs-Ag is fixed only by the ratio of each candidate. Thus for a given AbI concentration the lower the MCSNP-Ag concentration, the higher the proportion of MCSNP-Ag bound to AbI at the end of the incubation step and therefore the higher the amount of MCSNPs-Ag-AbI trapped in the chamber during the preconcentration step. The effect of the MCSNPs concentration on the fluorescent signal is shown in figure 3B, the highest fluorescent signals was obtained for the lowest MCSNPs concentrations whereas using the highest MCSNPs concentration the signal was not detectable. The immunoassay sensitivity was then inversely proportional to the initial MCSNPs-Ag concentration during the Ag/AbI incubation. Finally, the time required for the MCSNPs confinement and the MCSNPs concentration should be balanced to shorten analysis time while keeping a high sensitivity. For the following studies, the MCSNPs concentration was set at  $6.6 \times 10^{11} \text{ MCSNPs mL}^{-1}$ .



**Figure 3.** A) Influence of initial MCSNPs concentration on the MCSNPs capture kinetics in the magnetic chamber for five different concentrations :  $6.7 \times 10^{11}$  (◆),  $2 \times 10^{12}$  (■),  $4 \times 10^{12}$  (▲),  $1 \times 10^{13}$  (○) and  $1 \times 10^{14}$  MCSNP mL<sup>-1</sup> (□). B) Influence of initial MCSNPs concentration on assay sensitivity. Target AbI and AbII\* were set at  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectively. Both AbI and AbII\* were incubated at the same time for 2 h incubation in colloidal phase. C) Interaction kinetic between Target AbI and AbII\* using the μTAS (■) or the MP (○). Target AbI (30 min in the μTAS and 2 h incubation in the MP) and AbII\* were set at  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectively.

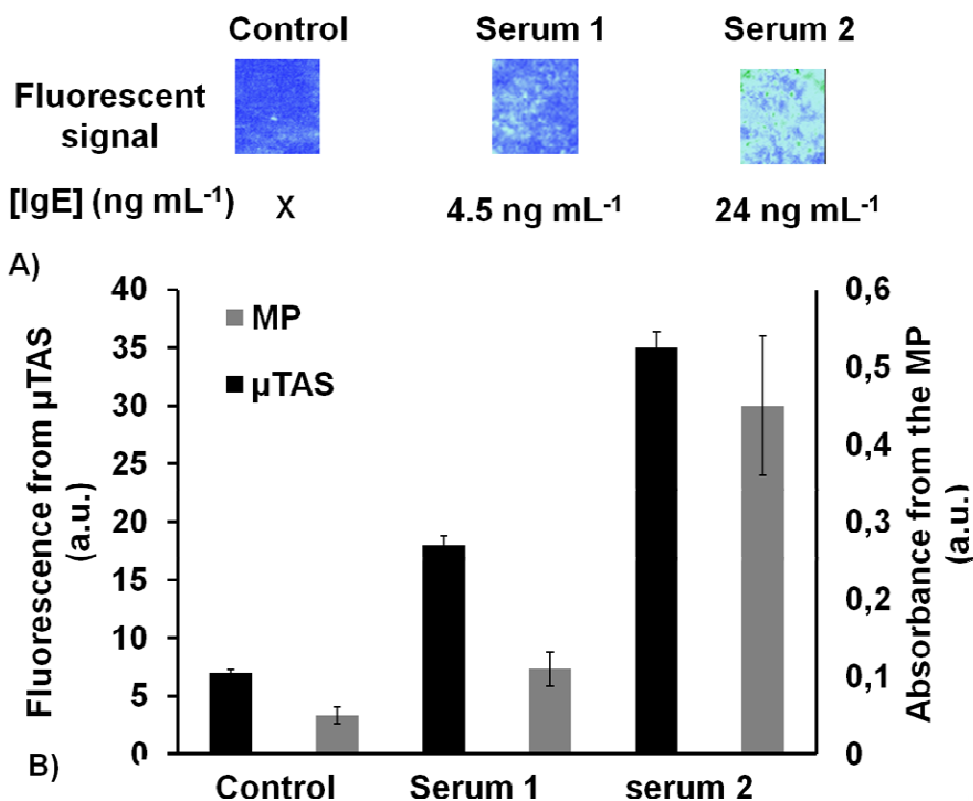
We then evaluated more specifically the advantages of the dedicated  $\mu$ TAS for AbI target quantification in terms of kinetic performances and immunoassay sensitivity. First we evaluated the potentiality of the developed  $\mu$ TAS for the determination of immunocapture reaction kinetics and wish to compare its kinetic performances to a gold standard *i.e.* an immunoassay performed with MP. Here, the time course of the AbI/AbII\* interaction has been investigated thanks to the fluorescent signal from AbII\*. As shown in Figure 2, the MCSNPs-Ag-AbI was confined within the magnetic chamber while AbII\* was flowing through it since a rinsing and a preconcentration step are required after the AbI capture, particularly when it is present at low concentration in a complex matrix like serum. As shown in Figure 3C, using the trapped MCSNPs within the magnetic plug, a plateau was reached after only 5 min of incubation, reducing drastically the assay time compared to MP. The AbII\* capture in the heterogeneous phase was described by a standard Langmuir-type adsorption process, the apparent 1<sup>st</sup> order kinetic rate constant of the AbI/AbII\* interaction was enhanced using the  $\mu$ TAS ( $k_{app} = 3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) compared to similar experiments performed with MP ( $k_{app} = 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). The kinetic improvement in the  $\mu$ TAS was related to the increase of the confined Ag concentration due to the magnetic trapping of MCSNP-Ag-AbI. The kinetic improvement of each incubation step allows to perform the entire assay within 25 min.

We next evaluated the immunoassay sensitivity from the  $\mu$ TAS concerning AbI quantification. On the basis that significant signal is three standard deviation above the control, the limit of detection (LOD) was about  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  using the  $\mu$ TAS whereas it was of  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  with conventional MP highlighting the sensitivity gain achieved using the  $\mu$ TAS. These results also underlined that using conventional MP, a catalytic amplification (ELISA) is necessary (Figure S1 in supporting information) to meet the sensitivity required for allergy diagnosis (ranging from  $1 \text{ ng/mL}$  to  $200 \text{ ng/ml}$ ) whereas signal amplification can be avoided using the  $\mu$ TAS.



**Figure 4.** A) An example of AbI concentration influence on the fluorescent signal in the magnetic chamber. B) Calibration curve of AbI using the MP (○) or the  $\mu$ TAS in two different approaches: AbI and AbII\* capture occurred successively in heterogeneous phase (▲) or AbI capture occurred in colloidal phase and AbII\* capture occurred in heterogeneous phase (■). AbI was incubated 5 min in the  $\mu$ TAS and 2 h in the MP. AbII\* was set at 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for 5 and 60 min incubation in the  $\mu$ TAS and the MP respectively. Details in supporting information. The inset is a focus on 0-10 ng mL<sup>-1</sup> AbI concentration when the AbI capture occurred in colloidal phase, the plots revealed a good linearity. The response was linear on 1-30 ng mL<sup>-1</sup> for ■, 30-300 ng mL<sup>-1</sup> for ▲ and 30-1000 ng mL<sup>-1</sup> for ○. The RSD (3 repetitions) was 1.3% with the  $\mu$ TAS and 8 % with the MP

In order to evaluate the advantage of using a colloidal suspension to capture AbI, a second approach has been carried out where a maximum S/V was used by confining the MCNSP-Ag in the magnetic chamber. We then performed both the Ag/AbI and AbI/AbII\* interactions successively within the packed bed of MCSNP-Ag. In this case, the LOD achieved was of the same order of magnitude than the one obtained by conventional MP (Figure 4). These results evidenced that using colloidal suspension to perform the first interaction might favor the immunological partners diffusion as well as the Ag accessibility. The combination of MCSNPs and microdevice presents three major advantages over conventional MP : the LOD was 30 times improved with a 20 fold time saving and the reagent consumption was about 5  $\mu$ L compared to the 200  $\mu$ L required for each MP well. The low volume of serum required is a particular key issue when dealing with milk allergy as it mainly concerns infants and young children whose sera are extremely precious.



**Figure 5.** (A) Fluorescent images observed in the  $\mu$ TAS for three different sera. (B) Fluorescence and absorbance intensity measured from the  $\mu$ TAS and the MP respectively for the three tested sera.

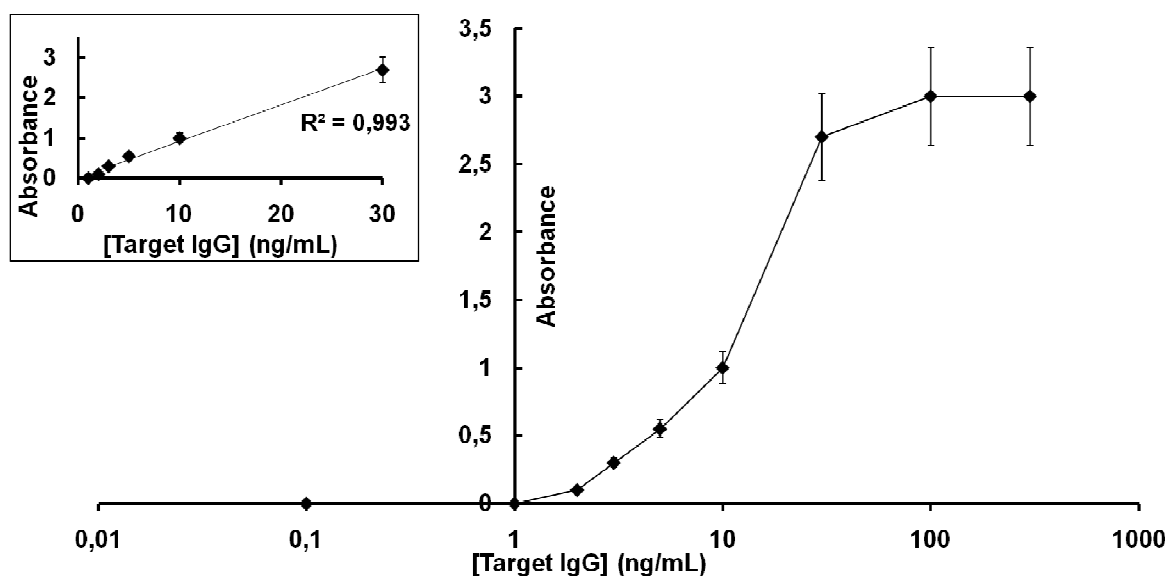
The diagnosis in the  $\mu$ TAS was performed as depicted in Figure 2. The sera were incubated for 5 min in the  $\mu$ TAS and 3 h in the MP. Then after washing step the detecting Ab (labeled with FITC or enzyme for  $\mu$ TAS and MP respectively) was incubated 5 min in the  $\mu$ TAS and 2 h in the MP. The detection in MP was performed by adding enzyme substrate for 30 min and coloration was read at 405 nm. The RSD (3 repetitions) was 2.7% with the  $\mu$ TAS and 12 % with the MP. See details in supporting information.

We finally applied this  $\mu$ TAS to milk allergy diagnosis in real sera samples (Figure 5). The diagnosis was based on the determination of specific IgE directed against one milk allergen ( $\alpha$ -lac). The determination of anti- $\alpha$ -lac IgE from three different sera was first evaluated by ELISA performed in MP, the anti- $\alpha$ -lac IgE concentration was estimated at 4.5 and 24 ng mL<sup>-1</sup> for 5 times diluted serum 1 and 2 respectively. Similar experiments were performed using this  $\mu$ TAS following the protocol depicted in Figure 2 and described in supporting information. A healthy patient sera was used as negative control (without anti- $\alpha$ -lac IgE), as expected it offers a lower signal than the two allergic patient sera. Moreover IgE concentrations from serum 1 and 2 were distinguished and exhibit the same tendency than the ones obtained with the ELISA in MP. These results underlined

the clinical applicability of this nanoparticle-based  $\mu$ TAS for allergy diagnosis as well as its compatibility to complex biological samples.

In conclusion we have demonstrated a new  $\mu$ TAS approach integrating MCSNPs to perform fast and sensitive immunoassays. This  $\mu$ TAS takes advantage of diffusing MCSNPs used as immunosupport to improve the target AbI capture kinetics as well as a magnetic chamber that allows the target preconcentration to achieve a higher sensitivity than the one observed in standard MP. The integrated steps of target capture, preconcentration and detection were completed in shortened analysis time with a reduced sample consumption compared to immunoassays performed in MP. We then demonstrated that the developed  $\mu$ TAS could be successfully applied to an easy and rapid allergy diagnosis by quantifying specific IgE from patient sera. It is envisioned that this system could integrate multiplexing and high throughput analysis using parallel channel

### Supplementary information



**Figure S1:** Calibration curve of target AbI obtained in microplate using catalytic amplification for the detection step. Target AbI was incubate for 3 h, phosphatase alcaline labeled anti target AbI at  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  was incubate for 2 h and after washing step, p-nitro phenyl phosphate (pNPP) substrate was incubate for 30 min and colored product was read at 405 nm. The inset is a focused on the 0-30  $\text{ng mL}^{-1}$  concentration range which exhibits a good linearity.

## References

- [1] N. Adkinson, B. Bochner, W. Busse, S. Holgate, R. Lemanske, F. Simons *Middleton's Allergy Principles and practice*, 7 Ed. (Eds.: N. F. Adkinson, B. Bochner, W. Busse, S. T. Holgate, R. Lemanske, F. E. Simons) Elsevier, **2008**.
- [2] C.-M. Cheng, A. W. Martinez, J. Gong, C. R. Mace, S. T. Phillips, E. Carrilho, K. A. Mirica, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2010**, *28*, 4881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4771.
- [3] a) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1213; b) K. S. Kim, J. K. Park, *Lab Chip* **2005**, *5*, 657; c) S. Y. Yang, K. Y. Lien, K. J. Huang, H. Y. Lei, G. B. Lee, *Biosens Bioelectron* **2008**, *24*, 855; d) H.-Y. Li, V. Dauriac, V. Thibert, H. Senechal, G. Peltre, X.-X. Zhang, S. Descroix, *Lab Chip* **2010**, *10*, 2597.
- [4] S. A. Peyman, A. Iles, N. Pamme, *Lab Chip*, **2009**, *9*, 3110.
- [5] a) Y.-F. Lee, K.-Y. Lien, H.-Y. Lei, G.-B. Lee, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 745; b) R. S. Sista, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, M. G. Pollack, S. Palanki, V. K. Pamula, *Lab Chip*, **2008**, *8*, 2188.
- [6] J. B.-H. Tok, F. Y. S. Chuang, M. C. Kao, K. A. Rose, S. S. Pannu, M. Y. Sha, G. Chakarova, S. G. Penn, G. M. Dougherty, *Angew. Chem.* **2006**, *41*, 7054; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6900.
- [7] a) X. Liu, Q. Dai, L. Austin, J. Coutts, G. Knowles, J. Zou, H. Chen, Q. Huo, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2780; b) J. Baudry, C. Rouzeau, C. Goubault, C. Robic, L. Cohen-Tannoudji, A. Koenig, E. Bertrand, and J. Bibette, *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 16076; c) L. Wang, Y. Zhu, L. Xu, W. Chen, H. Kuang, L. Liu, A. Agarwal, C. Xu, N. A. Kotov, *Angew. Chem.* **2010**, *32*, 5604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5472.
- [8] F. Destremaut, J.-B. Salmon, L. Qi, J.-P. Chape, *Lab Chip*, **2008**, *8*, 950.
- [9] V. Maurice, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, V. Cabuil, *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1408.
- [10] a) F. d'Orlyé, A. Varenne, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2572 ; b) J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.-M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2754.
- [11] J. C. McDonald, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 491.
- [12] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. K. Wu, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 27.
- [13] V. Maurice, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, V. Cabuil *J. Magn. Magn. Mater* **2009** *321*, 1408.
- [14] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.-C. Hennion, *Talanta* **2010**, *81*, 1703.
- [15] S. Krishnamurthy, P. Bhattacharya, P. E. Phelan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 419.

[16] T. Georgelin, S. Bombard, J.-M. Siaugue, V. Cabuil, *Angew. Chem.* **2010**, *47*, 9081; *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 8897.

[17] B. Teste, F. Malloggi, A.-L. Gassner, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, A. Varenne, H. Girault, S. Descroix, *Lab Chip*, **2011**, *11*, 833.

[18] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.-C. Hennion, *Talanta* **2010**, *81*, 1703.

[19] B. Teste, F. Kanoufi, S. Descroix, P. Poncet, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.-C. Hennion, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *in press*.



## IV°) Conclusion

Ce dernier chapitre permet ainsi de conclure qu'il est possible d'utiliser des NPCC en tant que support d'immuno-interaction afin de développer un microsysteme bioanalytique intégrant un immunoessai dédié au diagnostic de l'allergie.

Pour ce faire, nous avons élaboré une chambre magnétique composée de billes de fer ferromagnétiques susceptibles de concentrer les lignes de champ d'un aimant permanent créant ainsi de forts gradients de champ magnétique et permettant le confinement de NPCC. Des études préalables de simulations numériques ont permis de cartographier la répartition des vecteurs  $B$  et  $F_{mag}$  au sein du microcanal. Ces simulations ont également démontré le gain apporté par la présence des billes de fer sur  $F_{mag}$  par rapport à un système n'en contenant pas. L'étude expérimentale a montré que la séquence confinement /relargage pouvait être effectuée en quelques secondes et que la chambre magnétique ne montrait aucune rémanence magnétique visible après suppression du champ extérieur. Il a également été montré que la géométrie de l'aimant, sa distance par rapport au canal et la quantité de matériau magnétique au sein des billes composant la chambre magnétique avaient une influence sur l'efficacité de capture des NPCC.

Après avoir démontré la capacité de la chambre magnétique à confiner ces NPCC, l'immunoessai, préalablement développé en batch, a été intégré au sein du microsysteme. Le caractère colloïdal des NPCC a permis de capturer la cible en l'absence de mécanismes d'agitation et la chambre magnétique a permis la séparation du complexe et des formes libres ainsi que la préconcentration de la cible avant sa détection. La détermination du taux d'IgE au sein de sérums de patients allergiques au lait a démontré la possibilité d'utiliser ce microsysteme en tant qu'outil de diagnostic de l'allergie, permettant une analyse 25 fois plus rapide et consommant 50 fois moins de réactifs que les techniques de références tout en conservant une grande sensibilité.

---

## Références

- [1] M. Chiari , M. Cretich, F. Damin, L. Cerlotti, R. Consonni *Electrophoresis* **2000**, 21, 909-916.
- [2] M. Poitevin, Y. Shakalisava, S. Miserere, G. Peltre, J.L. Viovy, S. Descroix *Electrophoresis* **2009**, 30, 4256-4263.
- [3] T. B. Stachowiack, D. A. Mair, T. G. Holden, L. J. Lee, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1088-1093.
- [4] A. Lionello, J. Josserand, H. Jensen, H.H. Girault, *Lab on chip* **2005**, 5, 1096-1103.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse a été de concevoir un microsystème bioanalytique intégrant des nanoparticules magnétiques dédié au diagnostic de l'allergie.

La démarche mise en place pour mener à bien ce projet a consisté dans un premier temps à développer des nanoparticules cœur-coquille (NPCC) en tant que support de l'interaction immunologique. Pour cela, des grains d'oxyde de fer magnétiques ont été encapsulés dans une coquille de silice dont la surface a été fonctionnalisée avec des groupements amines et des chaînes de PEG. Ces objets ont été choisis car ils présentent deux avantages majeurs. Le premier est lié à la stabilité colloïdale et au mouvement brownien des NPCC qui leur permettent de diffuser en solution sans jamais sédimenter. Le second avantage est lié aux propriétés magnétiques qui permettent de manipuler ces objets sous champ magnétique. Différents types de NPCC ont été élaborés en faisant varier le rapport APTS/PEOS offrant ainsi des caractéristiques et une chimie de surface modifiables à façon. Ces nanoparticules présentent un diamètre physique de 35 nm et un diamètre hydrodynamique de 40 nm. Des études en électrophorèse capillaire et en zétamétrie ont permis de déterminer la charge de surface de ces NPCC.

Après avoir caractérisé ces NPCC, la molécule de capture (dans notre cas l'Ag) a été greffée à leur surface via les groupements amines. Pour ce faire, un plan d'expériences a été élaboré afin d'optimiser le greffage covalent de l'Ag de capture à la surface des nanoparticules. Ainsi, l'influence de différents facteurs tels que les rapports molaires NHS/EDC, EDC/ $\alpha$ -lac et la concentration en  $\alpha$ -lac a été évaluée sur la densité de greffage de l'Ag à la surface des NPCC. Une fois les conditions optimales déterminées, la reconnaissance de l'Ag par son Ac spécifique a été évaluée et nous avons montré que la reconnaissance Ag/Ac était maintenue après greffage de l'Ag. En revanche, le greffage de l'Ag à la surface des NPCC entraîne une modification de leur charge de surface et modifie leur stabilité en solution. En effet, initialement, la présence des groupements amines permet d'assurer une bonne répulsion électrostatique des nanoparticules. Le greffage de l'Ag entraîne le recouvrement des fonctions amines et la charge de surface dépend alors de la charge globale de la protéine greffée et des groupements résiduels qui ne sont pas engagés dans le greffage. En fonction du tampon de redispersion nous avons observé que l'utilisation d'électrolytes de pH acide permettait de conserver plus longtemps le caractère colloïdal des NPCC. En effet, pour des électrolytes de pH inférieur au pI de la protéine (pI = 4,5) la charge globale de surface est

positive ce qui favorise la répulsion entre les objets. Néanmoins à pH 7,5 la stabilité colloïdale peut être maintenue pendant 2 à 3 jours.

Nous avons par la suite utilisé ces NPCC greffées avec l'Ag pour élaborer un immunoessai en batch. Une première étude concernant la cinétique de la réaction Ag/Ac a permis de démontrer l'intérêt d'utiliser une plateforme de dimension nanométrique car cette dernière permet d'accélérer la cinétique de capture de l'Ac cible par rapport aux supports micro et millimétriques. Ce phénomène a notamment été expliqué par l'augmentation du rapport surface sur volume lors de l'utilisation des nanoparticules. En revanche, l'augmentation de ce rapport surface sur volume peut également entraîner une diminution de la constante d'affinité entre l'Ag et l'Ac cible. En effet, une augmentation de la fraction volumique en nanoparticules pourrait favoriser les rencontres et donc l'agrégation de ces dernières. Suite à ces études cinétiques, l'influence de la chimie de surface *i.e.* le rapport APTS/PEOS sur la capacité et la spécificité de capture de la cible a été étudiée. Les NPCC présentant un faible rapport APTS/PEOS ont été préférées car la spécificité de la capture est améliorée tout en conservant une capacité de capture élevée. Les résultats obtenus concernant l'immunoessai en batch ont montré que la sensibilité pouvait être améliorée d'un facteur 10 par rapport aux techniques conventionnelles et que le temps total d'analyse pouvait être réduit à 50 minutes. L'analyse de sérum de patients allergiques au lait a démontré l'adéquation entre les quantités d'IgE mesurées en utilisant les NPCC et la microplaque comme support de la réaction immunologique. Ces résultats ont également montré la stabilité de tels objets dans une matrice complexe telle que le sérum. Malgré les avantages précédemment décrits, le principal inconvénient des NPCC est lié aux temps de rinçage qui représentent 60 % du temps total d'analyse, de plus l'immunoessai en batch consomme des volumes d'échantillons et de réactifs du même ordre de grandeur que les immunoessais conventionnels.

L'intégration de cet immunoessai au sein d'un microsystème a permis de s'affranchir de ces limitations. La première étape de l'élaboration du microsystème a porté sur le développement d'un dispositif miniaturisé permettant le confinement des NPCC pour les étapes de rinçage et de préconcentration de la cible avant sa détection. En effet, l'agitation thermique des nanoparticules et leur faible teneur en matériau magnétique ne permettent pas d'utiliser un simple aimant pour confiner ces objets. Ainsi, des billes de fer ferromagnétiques piégées mécaniquement ont été utilisées pour élaborer une chambre magnétique. En présence d'un aimant permanent, ces billes de fer se magnétisent en concentrant les lignes de champ magnétique de l'aimant. Une double approche combinant études expérimentales et simulations numériques, effectuées en collaboration

avec l'équipe du Pr H.H. Girault (LEPA, EPFL), ont permis de montrer que localement la valeur de la force magnétique subie par les NPCC augmente en présence de ces billes de fer permettant ainsi leur confinement magnétique. L'étape suivante a porté sur l'intégration de l'ensemble de la procédure analytique de l'immunoessai au sein du microsystème. L'utilisation des NPCC comme immunosupport a permis d'effectuer la capture de l'Ac cible en phase colloïdale. La chambre magnétique a permis le confinement magnétique des nanoparticules et donc de la cible pour réaliser les étapes de séparation et de préconcentration. Le diagnostic de l'allergie au lait au sein de ce microsystème a été effectué avec des temps d'analyse 25 fois plus rapides qu'en microplaque et en réduisant d'un facteur 50 la consommation d'échantillons et de réactifs tout en conservant la même sensibilité. Ce paramètre est d'autant plus critique dans notre cas d'étude de l'allergie au lait car celle-ci concerne majoritairement les enfants en bas âge pour lesquels nous disposons de faibles volumes de sérum.

Ces travaux ont ainsi permis de faire la preuve de concept de l'utilisation de NPCC en microsystème pour le développement d'immunoessais. A partir de ces résultats, différentes perspectives sont alors envisageable.

Au cours de nos travaux, nous avons observé que contrairement aux NPCC non fonctionnalisées avec l'Ag, les NPCC greffées avec ce dernier, ayant réagi ou non avec l'Ac cible, ne peuvent être relarguées à pH physiologique après avoir retiré l'aimant extérieur. Différentes hypothèses ont été avancées : la première portait sur de possibles interactions non spécifiques entre les billes de fer et les protéines présentes à la surface des NPCC. L'utilisation de billes de fer passivées par un polymère neutre et hydrophile n'a pas permis de modifier le pourcentage de NPCC relarguées. Le fait que seule une fraction très faible de NPCC greffées puisse être relarguée semble montrer que des agrégats de nanoparticules se forment au sein de la chambre magnétique et sont alors piégés mécaniquement. La formation de ces agrégats pourrait être liée à la forte concentration locale de protéines et de nanoparticules au sein de la chambre et plus précisément aux pôles des billes de fer. La présence de ces agrégats pose problème lorsque l'on envisage une détection hors de la chambre magnétique, néanmoins nous avons pu exploiter ce phénomène au cours d'études préliminaires d'immunoessais par agglutination. Des études ont été menées en utilisant notamment des nanoparticules fluorescentes. Nous avons ainsi montré que lorsque le confinement magnétique et le relargage des NPCC fonctionnalisées était réalisé à pH acide (inférieur à pH 4) et en absence d'Ac cible, l'ensemble des nanoparticules pouvait être relargué. Ces résultats peuvent être corrélés avec des travaux menés en parallèle en électrophorèse capillaire [1]. Ces études ont montré qu'à pH 4

(pH inférieur au pI de l' $\alpha$ -lac), la charge de surface des NPCC-Ag est positive ; il peut donc y avoir répulsion électrostatique entre NPCC-Ag et donc limitation de la formation d'agrégats. A contrario, en présence d'Ac spécifiques, toutes choses égales par ailleurs, seule une fraction des nanoparticules piégées peut être relarguée. Ces résultats montrent que la réaction Ag-Ac est maintenue à pH 4, même si la constante d'affinité est certainement plus faible qu'à pH 7,5, et que la formation d'agrégats à ce pH est principalement liée à des interactions Ag/Ac qui doivent générer un « pontage » des nanoparticules. Nous avons ainsi montré que plus la concentration en Ac spécifique est importante, plus le nombre d'agrégats formés sera important et donc plus la fraction de nanoparticules relarguées est faible. Nous avons également montré la spécificité de cette approche en utilisant des Ac non-spécifiques. Les premiers résultats obtenus sont encourageants et des expériences complémentaires sont en cours.

En parallèle, afin d'éliminer la contrainte liée à la présence d'un plug de billes de fer confinées mécaniquement au sein du canal, une autre approche a été envisagée pour effectuer le confinement magnétique des nanoparticules.

Cette approche consiste à développer un PDMS magnétique intégrant dans la matrice polymère des billes ou des nanoparticules magnétiques, ainsi les éléments magnétiques ne sont plus au sein du canal mais autour du canal. Des expériences préliminaires ont montré que les billes de fer (6-8  $\mu$ m) pouvaient être dispersées dans le PDMS avant la confection de la puce, et qu'il était alors possible de piéger efficacement des billes magnétiques micrométriques (4 $\mu$ m de diamètre). Le confinement des NPCC est également possible dans cette configuration mais reste moins efficace (capacité de capture 15 fois plus faible) et moins homogène que l'approche de la chambre magnétique. En effet, les valeurs de champ magnétique diminuent lorsque l'on s'éloigne de la couche de PDMS magnétique ainsi, seules les nanoparticules proches de la paroi du canal subissent une force magnétique suffisante pour être piégées. En collaboration avec J. Fresnais (PECSA), nous avons également travaillé sur la compatibilité de nanoparticules d'oxyde de fer avec le PDMS pour élaborer un PDMS magnétique. Enfin, nous envisageons également de microfabriquer des structures de type pilier au sein du canal afin d'augmenter la capacité de capture des nanoparticules au sein de ces microsystèmes. Ce PDMS magnétique, même si il est moins efficace que le plug de billes de fer, pourrait présenter d'autres intérêts dans le cadre du confinement et de la manipulation de billes de taille micrométrique.

## Références

- [1] J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.-M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne *electrophoresis*, **2010**, 31, 2754-2761.





# ANNEXES

## Annexe 1 : synthèse des nanoparticules $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> citratées

### 1) Procédé Massart

- ✓ Préparer 3 L d'une solution de chlorure ferrique en ajoutant 715 mL de FeCl<sub>3</sub> (2,17 mol.L<sup>-1</sup>) dans de l'eau distillée
- ✓ Préparer une solution obtenue à partir de 180 g de FeCl<sub>2</sub> (1,42 mol) fraîchement dissous dans un mélange contenant 100 mL d'acide chlorhydrique concentré (12,1 mol.L<sup>-1</sup>) et 500 mL d'eau distillée
- ✓ Mélanger les deux solutions
- ✓ Ajouter rapidement une solution d'ammoniaque concentrée (1 L, 11 mol.L<sup>-1</sup>). Cette étape conditionne la taille des particules
- ✓ Agiter fortement (400 tr.min<sup>-1</sup>) la solution pendant 30 min, puis décanter sur plaques magnétiques
- ✓ Laver une fois le précipité obtenu à l'eau distillée
- ✓ Ajouter au précipité une solution de 360 mL (0,72 mol) d'acide nitrique concentré (11 mol.L<sup>-1</sup>) étendue à 2L avec de l'eau distillée
- ✓ Après 30 min d'agitation, décanter l'ensemble sur plaques magnétiques.
- ✓ Ajouter au précipité une solution de nitrate ferrique bouillante Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (323 g, 800 mL, 1,67 mol.L<sup>-1</sup>)
- ✓ Agiter l'ensemble à ébullition pendant 30 min puis décanter sur plaques magnétiques
- ✓ Reprendre le précipité par 2 L d'une solution d'acide nitrique (1,98 mol.L<sup>-1</sup>)
- ✓ Après 10 min d'agitation, décanter la solution sur plaques magnétiques
- ✓ Laver le précipité obtenu 3 fois à l'acétone et 2 fois à l'éther avant d'e le disperser dans 1 L d'eau distillée
- ✓ Eliminer l'éther résiduel en chauffant à 40°C au bain-marie

### 2) Citration

- ✓ Ajouter 28 g (9,52.10<sup>-2</sup> mol) de citrate de sodium à 600 mL de ferrofluide précurseur acide
- ✓ Chauffer l'ensemble à 80°C, agiter pendant 30 min, puis décanter sur plaques magnétiques à température ambiante
- ✓ Précipiter le mélange avec 400 mL d'acétone
- ✓ Après 2 lavages à l'acétone et 2 à l'éther, disperser le précipité dans un volume d'eau distillée déterminé suivant la fraction volumique en particules voulue
- ✓ Evaporer l'éther résiduel à 40°C au bain-marie

## Annexe 2 : synthèse des nanoparticules

### $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@SiO_2(\text{PEG-NH}_2)$

#### 1) Matériel

- TétraEthOxySilane (TEOS)
- 3-AminoPropylTriethoxySilane (APTS)
- 2-[methoxy(PolyEthyleneOxy)propyl]trimethoxySilane (PEOS)
- Ammoniaque 30%
- Ether diéthylique
- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Solution de maghémite citraté  $[\text{Fe}] = 3.10^{-1} \text{ molL}^{-1}$
- Rhodamine isothiocyanate (RITC) / Fluoresceine isothiocyanate (FITC)
- Solution tampon MOPS, pH7,4 ; I = 100mM

#### 2) Conditions expérimentales

##### Synthèse d'une couche de silice

- ✓ Dans un flacon de 30 mL, introduire 5mL d'eau distillée et 10mL d'éthanol
- ✓ Ajouter 300 $\mu\text{L}$  ( $9.10^{-5}$  mol de fer) de la solution de maghémite citraté
- ✓ Ajouter 120 $\mu\text{L}$  ( $5.10^{-4}$  mol) de TEOS
- ✓ Initier la condensation du TEOS par 250 $\mu\text{L}$  ( $1,8.10^{-3}$  mol) d'ammoniaque
- ✓ Vortexer immédiatement
- ✓ Laisser agiter 12h

##### Synthèse d'une couche de silice fluorescente (échantillon 2)

- ✓ Peser 20mg ( $4.10^{-5}$  mol) de RITC ( $4.10^{-5}$  mol) ou de FITC ( $5.10^{-5}$  mol)
- ✓ Ajouter 2mL d'éthanol
- ✓ Ajouter 19 $\mu\text{L}$  ( $8.10^{-5}$  mol) d'APTS (synthèse RITC) ou 24 $\mu\text{L}$  ( $10.10^{-5}$  mol) d'APTS (synthèse FITC)
- ✓ Dégazer la solution
- ✓ Laisser agiter au moins 8h à l'abri de la lumière
- ✓ Dans un flacon de 30 mL, introduire 5mL d'eau distillée et 10mL d'éthanol
- ✓ Ajouter 300 $\mu\text{L}$  ( $9.10^{-5}$  mol de fer) de la solution de maghémite citraté
- ✓ Ajouter 120 $\mu\text{L}$  ( $5.10^{-4}$  mol) de TEOS
- ✓ Initier la condensation du TEOS par 250 $\mu\text{L}$  ( $1,8.10^{-3}$  mol) d'ammoniaque
- ✓ Vortexer immédiatement
- ✓ Ajouter 20 $\mu\text{L}$  ( $9.10^{-7}$  mol) d'ATPS\* (synthèse RITC) ou 17 $\mu\text{L}$  ( $9.10^{-7}$  mol) de d'ATPS\* (synthèse FITC)

- ✓ Laisser agiter 12h à l'abri de la lumière

#### Fonctionnalisation de la couche de silice

- ✓ Ajouter 40 $\mu$ L ( $1,8 \cdot 10^{-4}$  mol) de TEOS puis 46 $\mu$ L ( $8,5 \cdot 10^{-5}$ ) de PEOS
- ✓ Ajouter l'APTS :

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H
V <sub>APTS</sub> ( $\mu$ L)	5	7.5	10	15	20	25	30	35
n <sub>APTS</sub> (mol)	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$4,3 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-5}$	<b><math>8,5 \cdot 10^{-5}</math></b>	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$

- ✓ Laisser agiter 12h (à l'abri de la lumière pour les échantillons fluorescents)

#### Lavage des échantillons

- ✓ Après 12 h d'incubation, les nanoparticules sont précipitées par l'ajout de 15mL d'éther
- ✓ Placer les flacons sur une plaque magnétique afin de décanter magnétiquement les agrégats de nanoparticules formés
- ✓ Eliminer la phase liquide en retenant magnétiquement le floculat de nanoparticules
- ✓ Précipiter les nanoparticules par l'ajout de 500 $\mu$ L d'éthanol absolu et de 25 mL d'éther
- ✓ Eliminer la phase liquide en retenant magnétiquement le floculat de nanoparticules
- ✓ Répéter cette opération 5 fois

#### Dispersion des échantillons

- ✓ Suite au dernier lavage, ajouter 2,5mL d'une solution tampon de MOPS
- ✓ Vortexer et transférer la solution dans un flacon de 10ml
- ✓ Ajouter de nouveau 2,5mL d'une solution tampon de MOPS
- ✓ Vortexer et transférer la solution dans le flacon de 10ml
- ✓ Vortexer le flacon de 10mL. Dégazer la solution afin d'éliminer les dernières traces d'éther
- ✓ Passer la solution 10min dans un bain à ultrason
- ✓ Stocker la solution à température ambiante ou à 4°C. Il est aussi possible de congeler les échantillons

En fin de synthèse, la concentration en fer des solution de nanoparticules est d'environ  $1,5 \cdot 10^{-2}$  mol/L correspondant à 12mg/mL de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG-NH}_2)$ .

## Annexe 3 : Dosage des fonctions amine par le test à la ninhydrine / Kaiser test

### 1) Matériel

- Tube d'ultrafiltration 100K (taille des pores ~10nm)
- Kaiser Test (Sigma Aldrich)
- Nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG-NH}_2)$   $[\text{Fe}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$
- Solution tampon MOPS, pH 7,4 ; I = 100mM

### 2) Conditions expérimentales

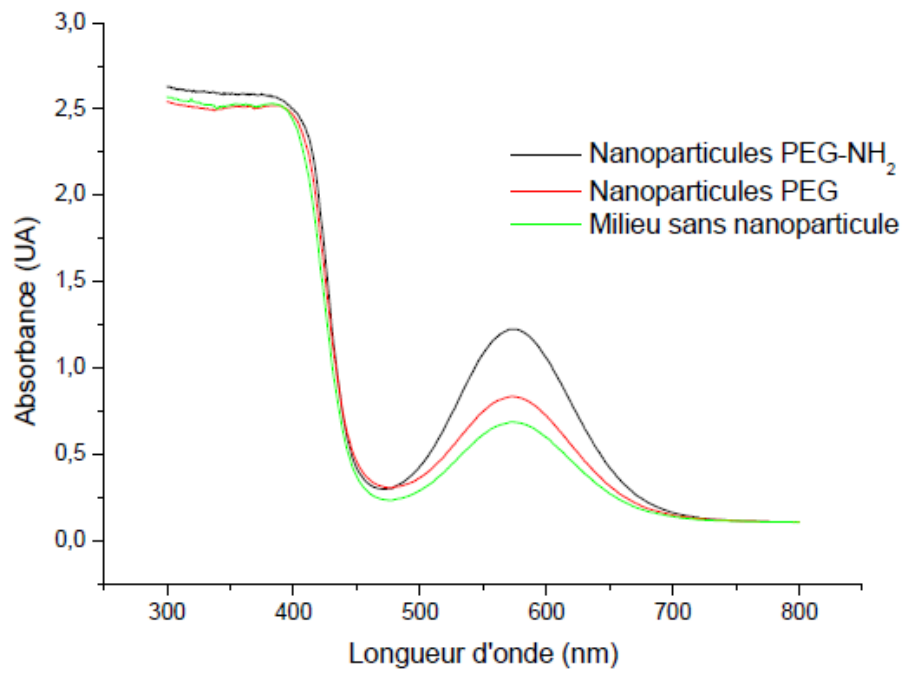
#### Préparation des échantillons

- ✓ Laver les échantillons de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG-NH}_2)$  à 3 reprises par ultrafiltration (15000G) à l'aide d'une solution de MOPS (I = 100mM, pH = 7,4)
- ✓ Préparer des échantillons  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG})$ . Ces nanoparticules serviront de blanc pour le dosage des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG-NH}_2)$ . Leur préparation est similaire aux nanoparticules aminées, l'APTS étant remplacé par la même quantité de matière de PEOS.
- ✓ Les échantillons  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG})$  sont dilués au  $10^{\text{ème}}$  et lavés à 3 reprises par ultrafiltration (15000G) à l'aide d'une solution de MOPS (I = 100mM, pH = 7,4)

#### Kaiser test (protocole fabricant)

- ✓ Introduire 100 $\mu$ l d'une solution de nanoparticules ( $[\text{Fe}] = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) dans un eppendorf.
- ✓ Ajouter 500 $\mu$ L d'une solution de KCN (dans un milieu eau / pyridine)
- ✓ Ajouter 500 $\mu$ L d'une solution de pyridine (dans ~80% d'éthanol)
- ✓ Ajouter 200 $\mu$ L d'une solution à 60% (volume) d'éthanol
- ✓ Placer l'eppendorf dans un bain marie à 100°C pendant 3 min
- ✓ Ajouter 200 $\mu$ L d'une solution de ninhydrine (6% dans l'éthanol)
- ✓ Placer l'eppendorf dans un bain marie à 100°C pendant 5 min
- ✓ Afin d'éliminer les nanoparticules du milieu, la solution est centrifugée pendant 10min et le surnageant est placé dans un nouvel eppendorf
- ✓ La solution est ensuite dosée en spectrométrie UV à la longueur d'onde de 578nm

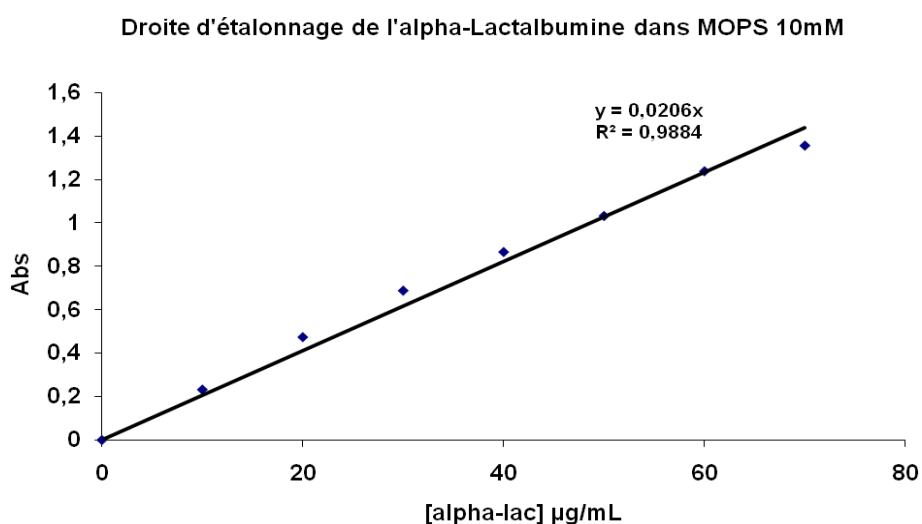
L'absorbance des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG-NH}_2)$  est corrigée par celle des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2(\text{PEG})$ . En effet, les nanoparticules, même en l'absence de fonctions amines à leur surface, induisent un signal lors du Kaiser test. La figure ci dessous montre l'absorbance des nanoparticules PEG, plus importante que celle du milieu sans nanoparticules.



## Annexe 4 : Quantification des protéines greffées sur les nanoparticules

Les protéines greffées à la surface des nanoparticules ont été quantifiées à l'aide du test BCA. Ce test consiste en la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines en milieu alcalin. Le  $\text{Cu}^+$  va ensuite réagir avec l'acide bicinchoninic pour former un complexe coloré (bleu-violet) dont l'intensité de coloration est lue à 562nm.

Pour cela une gamme d'étalonnage a été élaborée à l'aide de la protéine libre ( $\alpha$ -Lac) sur une gamme de concentration allant de 10 à 70  $\mu\text{g/mL}$ . 150  $\mu\text{L}$  de solution de protéine sont mélangés à 150  $\mu\text{L}$  de la solution de BCA pendant 2h à 37°C. La lecture s'effectue sur 300  $\mu\text{L}$  de cette solution à 562 nm.



Après le greffage de la protéine sur les nanoparticules, 150  $\mu\text{L}$  de la solution de greffage sont mélangés à 150  $\mu\text{L}$  de la solution de BCA pendant 2h à 37°C. Les nanoparticules sont ensuite isolées par centrifugation (15 000 g /5 min) et 300  $\mu\text{L}$  du surnageant sont lus à 562 nm.

## Annexe 5 : Article 5

2572

Electrophoresis 2009, 30, 2572–2582

Fanny d'Orlyé<sup>1</sup>  
 Anne Varenne<sup>1</sup>  
 Thomas Georgelin<sup>2</sup>  
 Jean-Michel Siaugue<sup>2</sup>  
 Bruno Teste<sup>3</sup>  
 Stéphanie Descroix<sup>3</sup>  
 Pierre Gareil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Electrochimie et  
 Chimie Analytique, Paris, France

<sup>2</sup>Laboratoire des Liquides  
 Ioniques et Interfaces Chargées,  
 Paris, France

<sup>3</sup>Laboratoire Environnement et  
 Chimie Analytique, Paris, France

Received December 23, 2008

Revised February 17, 2009

Accepted February 24, 2009

## Research Article

## Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particles by capillary zone electrophoresis

In view of employing functionalized nanoparticles (NPs) in the context of an immuno-diagnostic, aminated maghemite/silica core/shell particles were synthesized so as to be further coated with an antibody or an antigen *via* the amino groups at their surface. Different functionalization rates were obtained by coating these maghemite/silica core/shell particles with 3-(aminopropyl)triethoxysilane and 2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]-trimethoxysilane at different molar ratios. Adequate analytical performances with CE coupled with UV-visible detection were obtained through semi-permanent capillary coating with didodecyldimethyl-ammonium bromide, thus preventing particle adsorption. First, the influence of experimental conditions such as electric field strength, injected particle amount as well as electrolyte ionic strength and pH, was evaluated. A charge-dependent electrophoretic mobility was evidenced and the separation selectivity was tuned according to electrolyte ionic strength and pH. The best resolutions were obtained at pH 8.0, high ionic strength (*ca.* 100 mM), and low total particle volume fraction (*ca.* 0.055%), thus eliminating interference effects between different particle populations in mixtures. A protocol derived from Kaiser's original description was performed for quantitation of the primary amino groups attached onto the NP surface. Thereafter a correlation between particle electrophoretic mobility and the density of amino groups at their surface was established. Eventually, CE proved to be an easy, fast, and reliable method for the determination of NP effective surface charge density.

**Keywords:**

Cationic nanoparticles / Charge density / Ferrofluids / Ionic strength / pH

DOI 10.1002/ejps.200800835

### 1 Introduction

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (NPs) with appropriate surface chemistry are widely used for numerous applications such as contrast enhancement agent in magnetic resonance imaging [1], tissue engineering [2], immunoassay [3], hyperthermia [4], drug delivery [5], and protein or cell separation [6, 7]. All of these biomedical applications require that the NPs

possess high magnetization values and a size smaller than 100 nm with narrow particle size distribution to ensure uniform physicochemical properties. Moreover, besides biocompatibility and non-toxicity, the surface coating of the magnetic particles has to be tailored to allow targetable delivery with particle localization in a specific area [8]. The magnetic properties of the NPs are in close correlation with their physical structure: their size and shape, their microstructure, and the chemical phases in which they are present. As for their biological behavior, it depends, in addition to the preceding parameters, on their polydispersity, their charge, and the nature of their coating. Several techniques are commonly used to determine these physicochemical parameters [9]. The size of the solid particle can be determined by transmission electron microscopy (TEM) [10]. This technique gives access to a number mean value and provides details on particle size distribution and shape. It does, however, require an analysis by image treatment and it has to be performed on a statistically significant number of particles. With regard to magnetic particles, magnetization measurements can be used not only to determine the magnetic properties of particles, but also to get information on their size distribution.

**Correspondence:** Professor Pierre Gareil, Laboratoire Physico-chimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques, UMR CNRS 7195, ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

**E-mail:** pierre-gareil@enscp.fr

**Fax:** +33-1-44-27-67-50

**Abbreviations:** APTES, 3-(aminopropyl)triethoxysilane; DDABr, didodecyldimethylammonium bromide; DLS, dynamic light scattering; LDV, laser Doppler velocimetry; PEOS, 2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trimethoxysilane; NPs, nanoparticles; TEM, transmission electron microscopy; TEOS, tetraethylorthosilicate



Thus, by fitting the experimental magnetization curve to Langevin function, particle number mean solid radius and polydispersity can be estimated [10, 11]. Dynamic light scattering (DLS) allows determination of the diffusion coefficient of colloidal particles which in turn gives access to particle *z*-average hydrodynamic radius and polydispersity [12, 13]. Micro-electrophoresis and laser Doppler velocimetry (LDV) are applied for measuring electrophoretic mobilities which can be converted into  $\zeta$ -potentials applying the appropriate model (Henry, Hückel, Smoluchowski, *etc.*) with respect to  $\zeta$ -potential and  $\kappa a$  values, where  $a$  is the distance from the center of the particle to the surface of shear and  $\kappa$  is the reciprocal Debye length [14, 15].

Over the last two decades, there has been an effort to extend CE applications to NP characterization [16, 17] since this technique can provide both information on particle size distribution and surface charge density. Moreover, the high selectivity of this separation method allows the characterization of different particle populations (organic [18–25] and inorganic [26–30]) in a mixture, as well as the detection of impurities present in the dispersant medium [31]. Until now, most studies focused on the characterization of particles bearing negative electrical charge, mainly on the basis of their size. Concerning ferrofluids, the work by Morneau *et al.* is worth noting. It examined the electrophoretic behavior of one neutral dextran-iron oxide colloid, one cationic oxide colloid, and four negatively charged ferrofluids according to the nature of the stabilizing group attached to the particle surface (lignin sulfonate, polystyrene sulfonate, and alginate). Broad electrophoretic profiles, typical of colloidal particles, were reported and the effect of pH, ionic strength, and applied voltage on particle electrophoretic mobility was studied. Although few authors measured positive mobilities in fused-silica capillaries for positively charged particles (either functionalized [32, 33] or not [31]), some others reported more experimental difficulties or unexpected phenomena [27, 34, 35]. The first attempt for the CE characterization of cationic colloids (amine-modified latex particles) was described by VanOrman and MacIntire [34] in 1994. Regardless to particle size, the positively charged particles all exhibited exactly the same, apparently negative mobility, which seems to indicate that particles adsorbed onto the inner wall of the fused-silica capillaries. These observations may explain why polyaniline particles were characterized as slightly negatively charged by Křivánková *et al.* [35] ( $-1$  to  $-2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) in contradiction to the expectations that these particles would bear a positive surface charge. In another study, Quang *et al.* [27] highlighted the unexpectedly large RSD values (larger than 100%) on model parameters (limiting mobility  $\mu_+$  and dissociation constant  $K_+$ ) characterizing positively charged metal iron particles, that were estimated by fitting experimental mobility data (as a function of pH) to a two-site dissociation model. These experimental difficulties were overcome by a few authors [36–38], who proposed different capillary modification strategies in order to ensure reliable mobility measurements for these cationic particles. In these studies, size-dependent electrophoretic

migrations were shown. To the best of our knowledge, the CE characterization and separation of cationic particle populations, homogeneous in size, but differing by the controlled density of ionizable functional groups at their surface have not been reported so far.

In this context, the charge-based separation of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core shell particles was studied. The inner wall of a silica capillary was modified so as to obtain a positive surface charge and thus allow the CE characterization of cationic particle populations. Eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations were synthesized, homogeneous in size, but differing by their surface charge density according to the molar ratio between the two silane derivatization agents. The influence of experimental conditions, such as electric field strength, injected particle amount as well as electrolyte ionic strength and pH, on particle electrophoretic mobility and separation performances was evaluated. Eventually, the relationship between the particle electrophoretic mobility and the density of attached amino groups was investigated.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Chemicals and reagents

Iron (II) chloride tetrahydrate, iron (III) chloride (in aqueous solution, 27% w/w), iron (III) nitrate, sodium chloride, orthophosphoric acid (85% w/w), hydrochloric acid, nitric acid, ammonia, acetone, diethyl ether, and standard 1 and 0.1 M NaOH and HCl solution Normadose were purchased from VWR (Strasbourg, France). tetraethylorthosilicate (TEOS), 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTES), Tris, 3-(*N*-morpholine)propanesulfonate (MOPS), didodecyldimethylammonium bromide (DDABr), citric acid, *N,N*-dimethylformamide, propylamine, and a Kaiser test kit composed of solutions of (i) phenol (~80% in ethanol), (ii) KCN (in H<sub>2</sub>O/pyridine), and (iii) ninhydrin (6% in ethanol) were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]-trimethoxysilane (PEOS), containing 3–6 ethylene oxide groups, was purchased from Gelest (Morrisville, PA, USA). Water used throughout was produced by a Direct-Q 3 system (Millipore, Molsheim, France).

Phosphate buffer was composed of 5.1 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/7.6 mM NaOH ( $I = 10$  mM), pH 7.0. Tris buffers of various ionic strength (1–100 mM) and pH values (7.0–8.2) were prepared by mixing with HCl. MOPS buffer was composed of 149.5 mM MOPS/100 mM NaOH ( $I = 100$  mM), pH 7.4. *N,N*-dimethylformamide was used as EOF marker at 0.05% v/v in buffer solution.

### 2.2 Ferrofluid synthesis

Maghemite NPs were prepared by co-precipitation of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions under alkaline conditions as described by

Massart [39]. NPs were then coated by citrate anions and dispersed in water [40]. These maghemite NPs were further encapsulated in silica shells. A first silica shell was prepared in ethanol medium, in the presence of ammonia as a catalyst, by condensation of TEOS. The silica shell functionalization was carried out through a second step by simultaneous condensation of a neutral and a cationic amino-based silane-coupling agent (PEOS and APTES, respectively). The concurrent addition of a small amount of TEOS resulted in the formation of a cross-linked silica shell [41]. A set of eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations with tuned surface charge density was obtained by varying the APTES to PEOS molar ratios (from 0.25 to 1.75). The amount of PEOS was kept constant ( $3.4 \times 10^{-4}$  mol), whereas the amount of APTES was varied (between  $8.5 \times 10^{-5}$  and  $6.0 \times 10^{-4}$  mol). Concurrently, a blank particle lot was prepared, corresponding to a zero-amount of APTES, and designated as PEG-functionalized NPs. The silica condensation reaction was carried out overnight and the resulting reddish particle suspension was then destabilized by addition of diethyl ether. A red precipitate was formed and isolated by magnetic settling. The precipitate was washed twice with a mixture of diethyl ether and ethanol (15:1) and then redispersed in the desired separation electrolyte for CE measurements. For the ninhydrine colorimetric test, the particle samples were ultrafiltered three times in a 100 mM MOPS buffer at pH 7.4 in order to eliminate all traces of ammonia (synthesis medium). TEM showed roughly spherical core-shell particles with a number mean solid diameter  $\langle D_N \rangle$  of 40 nm and an average of four encapsulated maghemite NPs ( $\langle D_N \rangle \geq 7$  nm, determined by magnetization measurements) per core [41]. On this basis, the core-shell particle volume fraction in each sample could be derived from determination of sample iron content by flame atomic absorption spectrometry.

### 2.3 CE apparatus and measurements

Electrophoretic measurements were performed with a HP<sup>3D</sup>CE system Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). An aliquot of 50  $\mu\text{m}$  id  $\times$  35 cm fused-silica capillaries (detection length, 26.5 cm) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) were used. Hydrodynamic injections were performed at the capillary inlet. Successive injection zones were performed in the following order: neutral marker (20 mbar, 2 s), particle sample (50 mbar, 2 s, unless otherwise specified), and electrophoretic buffer (20 mbar, 2 s). The applied voltage was  $-10$  kV unless otherwise specified. The temperature of the capillary cartridge was set at 25°C. The detection wavelength for the EOF marker was 200 nm. As for the particles, it was either 200 or 254 nm depending on the BGE nature. Prior to first use, bare fused-silica capillaries were activated by successive flushes with 1 M NaOH and 0.1 M NaOH for 15 min each and water for 5 min under 925 mbar. For DDABr modifica-

tion [42], the capillary column was first activated as reported before. The initial capillary modification procedure consisted in a 5 min flush with a 0.1 mM DDABr solution in 10 mM HCl, followed by a 3 min flush with the electrophoretic buffer to move out the excess surfactant and equilibrate the capillary. Between each run, the capillary was rinsed with the DDABr solution for 2 min and with electrophoretic buffer for 1 min, always under the aforementioned pressure.

### 2.4 Ninhydrine colorimetric test protocol

This test is based on the reaction of ninhydrine with primary amino groups leading to the formation of a chromophore (Ruhemanns Blue) that is detached from the particle surface so that an intense blue color develops in the particle dispersion solution [43, 44]. Direct spectrophotometric quantitation of this chromophore allows determination of the total number of amino groups originating from particle surface, using propylamine as a standard for the determination of the extinction coefficient. The amino group density (equivalent/nm<sup>2</sup>) on derivatized core/shell particles can then be derived from known core/shell particle diameter and volume fraction in the titrated sample, determined as described previously. Typically, 100  $\mu\text{L}$  of a dispersion of amino/PEG-functionalized core/shell particles ( $[\text{Fe}] = 3 \times 10^{-3}$  mol/L, sample iron content determined by flame atomic absorption spectrometry) were added to a mixture of 500  $\mu\text{L}$  KCN (in H<sub>2</sub>O/pyridine), 500  $\mu\text{L}$  pyridine (~60% in ethanol), and 200  $\mu\text{L}$  EtOH (60% v/v in water). The mixture was placed at 100°C for 3 min. Two hundred microliters of a ninhydrine solution (6% in ethanol) were then added and the mixture was placed at 100°C for 5 min. To avoid any light-scattering effects due to particles in suspension, a final centrifugation (10 min) was added to the classical protocol so as to force the particles into settling down and to easily sample the supernatant. The spectrophotometric determination of the released chromophore was performed on supernatant samples with a UVIKON XL UV-Visible spectrophotometer (SECOMAM, Alès, France) at 578 nm, using Suprasil quartz cuvettes (700  $\mu\text{L}$  working volume, 10 mm path-length). The blank sample consisted in PEG-functionalized core/shell particles dispersed in identical medium, at the same volume fraction.

### 2.5 Complementary particle characterizations: TEM, DLS, and LDV

TEM was used for size and morphology characterization. TEM images were obtained using a JEOL 100CX2 microscope (JEOL Europe, Croissy sur Seine, France) operating at 65 keV. DLS and LDV measurements were performed with a Nano ZS Zetasizer (Malvern Instrument, Worcestershire, UK) to independently determine the particle size distributions and electrophoretic

mobilities for comparison purposes (electrolyte and temperature conditions identical to those used for CE measurements).

### 3 Results and discussion

To date, cationic colloids have received only little attention, likely due to more experimental difficulties in CE separation. The main difficulty relies on particle adsorption to the inner wall of the bare fused-silica capillary. To prevent this adsorption and ensure reliable mobility measurements of these cationic magnetic particles, a dynamic modification protocol of the capillary was optimized in a previous study by our group [38]. This capillary treatment involved the double-chained cationic surfactant DDABr, which is known to form a stable flat bilayer electrostatically adsorbed to the capillary wall [42]. This modification only requires short equilibration time and its semi-permanent feature allows to perform analyses in surfac-

tant-free electrolytes, thus preventing any possible interaction with particles of interest. Furthermore, high-magnitude anodic EOF are generated (ca.  $-50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in a separation electrolyte composed of 116.5 mM Tris+100 mM HCl ( $I = 100 \text{ mM}$ ), pH 7.4) so that cationic particles with high electrophoretic mobility can migrate counter-electroosmotically and be detected within a short time under a wide range of ionic strengths.

In view of employing magnetic NPs in the context of an immunodiagnostic, amino/PEG-functionalized core/shell particles were synthesized for further derivatization with an antibody or an antigen *via* the pending amino groups at their surface. For this purpose, a ferrofluid was first synthesized, consisting of maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) particles stabilized in an aqueous solution by adsorbed citrate anions to their surface. Such particles were further encapsulated in silica shells and the resulting maghemite/silica core/shell was functionalized with APTES and PEOS (Fig. 1).



**Figure 1.** Reaction scheme of the synthesis of the nano-metric bifunctional maghemite/silica core/shell particles.

**Table 1.** Designation and characterization of the synthesized maghemite/silica core/shell particle populations

Core/shell population	General characteristics		Size (nm) <sup>a)</sup>	Mobility <sup>b)</sup> ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
	APTES/PEOS	Dispersion medium		
NP1	0	Distilled water, pH adjusted to 7.0 by addition of $\text{HNO}_3$	79 (0.083)	-11.3
NP2	1		93.3 (0.084)	10.5
NP3.1	0.25		66 (0.072)	4.9
NP3.2	0.5		67.2 (0.088)	8.0
NP3.3	0.75	116.5 mM Tris + 100 mM HCl ( $I = 100 \text{ mM}$ ), pH 7.4	63.9 (0.086)	9.5
NP3.4	1		66.5 (0.069)	10.4
NP4.1	0.25		78.4 (0.086)	2.5
NP4.2	0.35		71.5 (0.068)	4.5
NP4.3	0.5		71.5 (0.084)	6.9
NP4.4	0.75		68.6 (0.098)	7.9
NP4.5	1		78.9 (0.091)	9.3
NP4.6	1.25		73.4 (0.084)	10.2
NP4.7	1.5	150 mM MOPS + 100 mM NaOH ( $I = 100 \text{ mM}$ ), pH 7.4	74.4 (0.083)	11.2
NP4.8	1.75		74.8 (0.084)	10.2
NP5.1	0.25		64.2 (0.065)	3
NP5.2	0.35		63.7 (0.101)	4.1
NP5.3	0.5		64.3 (0.064)	7.5
NP5.4	0.75		63.6 (0.084)	8.2
NP5.5	1		62.2 (0.1)	11.0
NP5.6	1.25		63.7 (0.077)	10.6
NP5.7	1.5	65.4 (0.072)	11.0	
NP5.8	1.75	65.7 (0.084)	10.1	

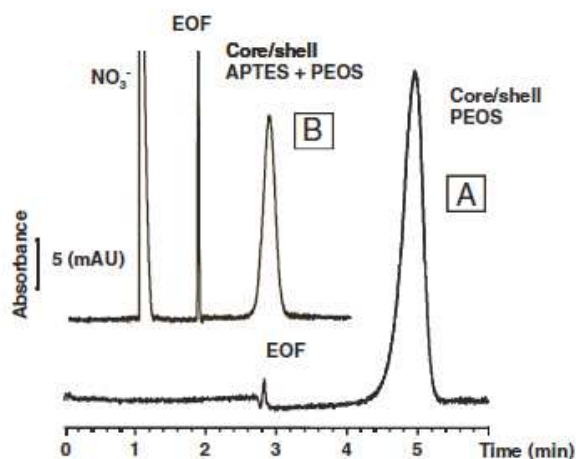
a) z-average diameter (in nanometer) determined by DLS, figures in parenthesis are polydispersity indexes.

b) Determined by LDV performed at 25°C.

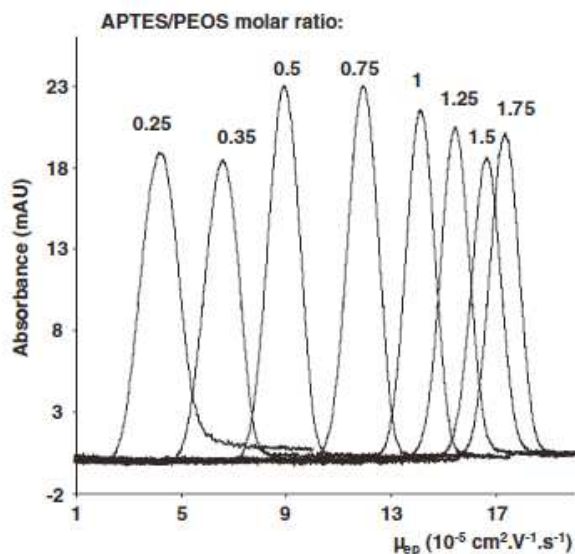
According to the APTES/PEOS molar ratio introduced during their synthesis (the amount of PEOS was kept constant, whereas the amount of APTES was varied), up to eight particle populations were obtained, homogeneous in size and polydispersity, but *a priori* differing by their surface charge density (Table 1). The surface charge of the particles dispersed in a Tris or a MOPS buffer is ensured by the protonated primary amino groups at their surface and should therefore be positive in the pH range 7–8. LDV measurements indicated an increase in mobility when the APTES/PEOS ratio was increased, but with a levelling off for the highest values.

For comparison purposes, a monofunctional core/shell particle population (PEG-functionalized NPs) was prepared with PEOS only. Figure 2 shows the electropherograms of PEG-functionalized core/shell NPs (NP1) in a bare fused-silica capillary and of amino/PEG-functionalized NPs in a 1:1 APTES/PEOS ratio (NP2) in a DDABr-modified capillary. NP1 migrates as a negatively charged analyte (Fig. 2A), which indicates that residual silanol groups are still present on this material. When APTES is added to PEOS at a 1:1 molar ratio for particle functionalization, the global charge of NP2 is measured positive (Fig. 2B).

The amino/PEG-functionalized NPs at different molar ratios (ranging from 0.25 to 1.75) were further characterized by first optimizing some experimental conditions, such as electric field strength, injected particle amount as well as electrolyte ionic strength and pH, with respect to particle electrophoretic mobility and separation performances. As an overview, Fig. 3 shows the electrophoretic behavior of eight amino/PEG-functionalized NPs (NP5.1 to NP5.8) in 150 mM MOPS/100 mM NaOH ( $I = 100$  mM), pH 7.4,



**Figure 2.** Electropherograms of the (A) PEG-functionalized core/shell particles (NP1) and (B) amino/PEG-functionalized core/shell particles (NP2, APTES/PEOS 1:1 molar ratio). Fifty micrometers  $id \times 35$  cm (detection length, 26.5 cm) (A) bare or (B) DDABr-modified fused-silica capillary. BGE: (A) 5.1 mM  $H_3PO_4$ /7.6 mM NaOH ( $I = 10$  mM), pH 7.0 or (B) 10.7 mM Tris/10 mM HCl ( $I = 10$  mM), pH 7.0. Applied voltage: (A) 10 kV or (B)  $-10$  kV. Hydrodynamic injection (30 mbar, 3 s), particle volume fraction 0.66%. Absorbance detection at 200 nm. Temperature: 25°C.



**Figure 3.** Influence of APTES/PEOS molar ratio on the electrophoretic mobility of eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations injected separately (mobility-scaled electropherograms). Fifty micrometers  $id \times 35$  cm (detection length, 26.5 cm) DDABr-modified capillary. BGE: 150 mM MOPS/100 mM NaOH ( $I = 100$  mM), pH 7.4. Applied voltage:  $-10$  kV. Hydrodynamic injection (50 mbar, 5 s), particle volume fraction 0.26%. Absorbance detection at 254 nm. Temperature: 25°C. Particle identification and characteristics: see Table 1 (NP5.1–NP5.8 series) according to mentioned APTES/PEOS molar ratio.

when injected separately. Indeed, in these conditions we experienced a monotonous increase in particle effective mobility, from  $4.3 \times 10^{-5}$  (RSD = 1.5%,  $n = 4$ ) to  $17.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (RSD = 1.1%,  $n = 4$ ), over an increasing APTES/PEOS molar ratio from 0.25 to 1.75.

### 3.1 Methodological development for charge-based separation

#### 3.1.1 Influence of electric field strength

The separation of the mixture of four amino/PEG-functionalized core/shell particle populations corresponding to APTES/PEOS molar ratios ranging from 0.25 to 1 (NP3.1–NP3.4) was performed in 106.6 mM Tris/100 mM HCl (100 mM ionic strength), pH 7.0, and the voltage was varied between  $-5$  and  $-10$  kV (*i.e.* the electric field value between 150 and 300 V/cm),  $-10$  kV corresponding to the limiting voltage above which current values ( $> 55.5 \mu\text{A}$ , in absolute values) are no more compatible with the thermoregulation capability of the CE instrumentation. When decreasing the separation voltage from  $-10$  to  $-5$  kV, particle mobility decreased by about 10% and resolution did not vary significantly ( $< 5\%$  increase for pairs NP3.1/NP3.2 and NP3.2/NP3.4), whereas the analysis time increased more than twice. These mobility variations can be attributed to the onset of Joule heating favored by the use of a

high ionic strength electrolyte (100 mM). Nevertheless, a voltage of  $-10$  kV was retained for further experiments as it gives the best compromise with respect to resolution and migration time.

### 3.1.2 Influence of injected particle amount

As expected, we evidenced that increasing injected volumes up to 5 nL did not markedly affect apparent peak efficiency but resulted in an enhanced signal intensity. Conversely, injected volumes above 5 nL (corresponding to 0.73% of the capillary volume) resulted in pronounced extra-column band broadening and resolution loss. Thus, a volume of 5 nL was retained as a compromise with respect to resolution and sensitivity.

Concerning the influence of the particle volume fraction in the injected sample, and so as to evidence potential interferences between different particle populations, separations of the mixture of four amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP5.1, NP5.3, NP5.5, and NP5.7) were performed at two-particle volume fractions differing by a factor of four (0.26 and 1.04%, respectively), and the electropherograms were compared with those obtained by injecting each particle population separately at the particle volume fraction of 0.26% (Fig. 4A and B). Thus, we evidenced that when the particle populations were injected as a mixture, in this volume fraction range, the less mobile particles were speeded up, as if they were dragged by the more mobile ones, as already reported in the literature concerning the mixture of different oxide particle populations [28]. Nevertheless, it is to be emphasized that dilution weakens these interferences, which become almost negligible at a total particle volume fraction of 0.055% (under these conditions, the limit of detection was estimated to *ca.*  $5 \times 10^{-3}\%$ ).

### 3.1.3 Influence of BGE ionic strength

The separation of the mixture of four amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP3.1–NP3.4, Table 1), for which APTES/PEOS molar ratio ranged from

0.25 to 1, was performed in Tris buffers, pH 7.0, at various ionic strengths (between 1 and 100 mM). In consequence of an increase in the electrolyte ionic strength, the EOF magnitude was shown to decrease and particle migration time to increase. Moreover, a marked increase in resolution between all pairs of particle populations was evidenced upon increasing electrolyte ionic strength, as shown in Fig. 5. Best analytical conditions will thus imply working under 100 mM ionic strength, as this otherwise does not prejudice particle stability.

For further discussions, each particle population was characterized with respect to its effective electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}$ ), calculated from migration time at peak apex, and mobility dispersion, determined as peak width measured at half height ( $\omega\mu_{ep}$ ). The electrophoretic mobility was next converted into reduced mobility ( $\bar{\mu}$ ), according to Eq. (1), and plotted as a function of the  $\kappa a$  product (Fig. 6A), where  $\kappa$  is the reciprocal Debye length and  $a$  is assimilated to the particle hydrodynamic radius (determined by DLS):

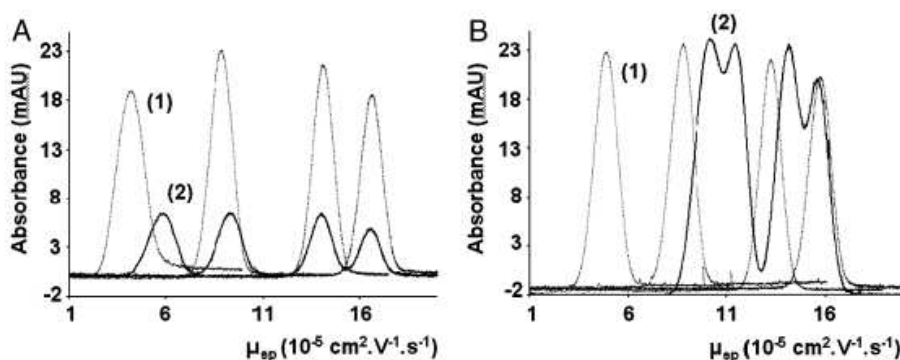
$$\bar{\mu} = \frac{2e\eta}{3\epsilon_0\epsilon_r k_B T} \mu_{ep} \quad (1)$$

where  $\eta$ ,  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_r$ ,  $k_B$  and  $T$  stand for BGE viscosity, dielectric vacuum permittivity, relative dielectric permittivity, Boltzman constant, and temperature.

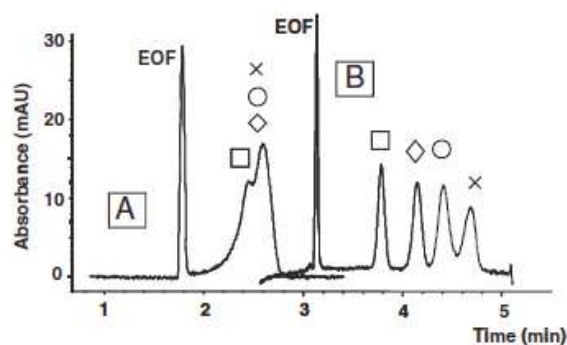
It is to be mentioned that  $\kappa$  is directly related to electrolyte ionic strength,  $I$ , according to Eq. (2):

$$\kappa(\text{nm}^{-1}) \approx 3.288 \sqrt{I(\text{mol/L})} \quad \text{in water at } 25^\circ\text{C} \quad (2)$$

Superimposed in Fig. 6A is the expected dependence of the reduced mobility on  $\kappa a$  product for different values of  $\zeta$ -potential (isopotential curves are represented in dashed lines) obtained from interpolation of the exact numerical solutions to the transport equations proposed by Wiersema [45] (case of a rigid, non-conducting sphere in a 1:1 electrolyte with the arbitrarily chosen dimensionless ionic drag coefficients  $m_+ = m_- = 0.184$  at  $T = 25^\circ\text{C}$ ). From these curves, we could estimate the  $\zeta$ -potential variations under-



**Figure 4.** Influence of particle volume fraction on the electrophoretic separation of the mixture of four amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP5.1, NP5.3, NP5.5, and NP5.7). Experimental conditions: see Fig. 3 except for particle volume fraction (A) (1) 0.26% for each population injected separately and (2) 0.26% (total volume fraction) in the mixture of four populations and (B) (1) 0.26% for each population injected separately and (2) 1.04% (total volume fraction) in the mixture of four populations. Note that electropherograms A and B were obtained from two different series of measurements.

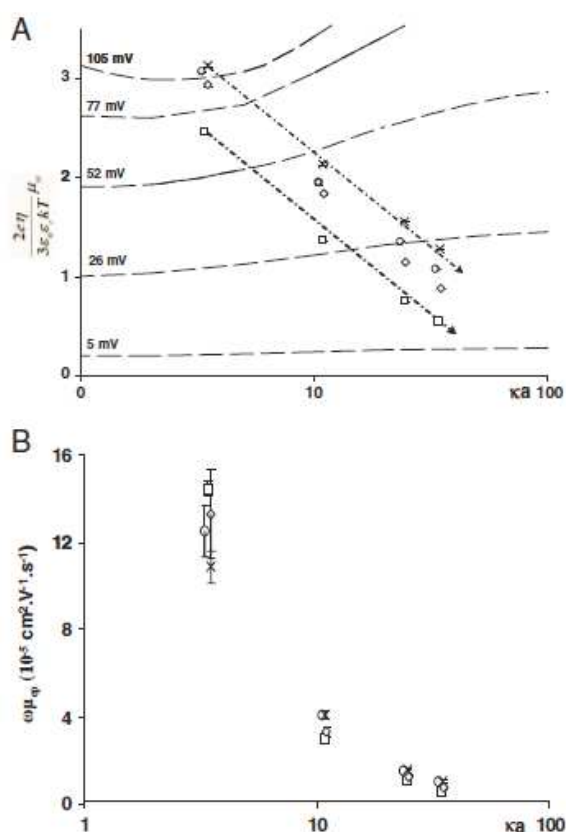


**Figure 5.** Influence of ionic strength on the electrophoretic separation of the mixture of four amino/PEG-functionalized core/shell particle populations. Fifty micrometers  $\text{id} \times 35 \text{ cm}$  (detection length, 26.5 cm) DDABr-modified capillary. BGE: (A) 10.7 mM Tris/10 mM HCl ( $I = 10 \text{ mM}$ ), pH 7.0 and (B) 106.6 mM Tris/100 mM HCl ( $I = 100 \text{ mM}$ ), pH 7.0. Hydrodynamic injection (20 mbar, 2 s), particle volume fraction 0.33% for each population in the mixture. Applied voltage:  $-10 \text{ kV}$ . Absorbance detection at 200 nm. Temperature:  $25^\circ \text{C}$ . Particle identification and characteristics: NP3.1 (open square), NP3.2 (open circle), and NP3.4 (cross) as defined in Table 1.

gone by the particles under the influence of the electrolyte ionic strength.

Over increasing electrolyte ionic strength (*i.e.* increasing  $\kappa$  values), the effective electrophoretic mobility of the core/shell particle populations decreased to an extent that is independent on particle charge density, which is reminiscent of retention variations in ion exchange chromatography for analytes having functionalized groups of identical valency. In other words, the difference in mobilities between two particle populations was roughly kept constant, over the whole range of ionic strength studied, as can be seen in Fig. 6A (dotted lines and directional arrows are guides for the eyes). As the particle populations were homogeneous in size, the selectivity of the separation should only be governed by the particle charge. Consequently, an increase in effective selectivities (defined as the ratio of the effective mobilities [46]) from 18 to 29%, considering each pair of particle populations, was evidenced upon increasing ionic strength, from 1 to 100 mM, this trend being more pronounced for the particle populations having the lower charge density.

Obviously, peak widths at half height ( $\omega_{\mu_{ep}}$ ) were also influenced by electrolyte ionic strength, and a sharp decrease in peak width (from 90 to 96%) was experienced over increasing ionic strength values from 1 to 100 mM, as shown in Fig. 6B. According to previous observations, this variation in particle mobility dispersion cannot be attributed to particle sample heterogeneity in charge, as related contribution would keep constant while varying the electrolyte ionic strength. Neither it can be due to a reversed stacking effect as long as the same variations in peak width were observed when the particle dispersion medium was the separation electrolyte itself, thus ensuring electrical



**Figure 6.** Influence of ionic strength on (A) the reduced mobility and (B) peak width calculated at half peak height ( $\omega_{\mu_{ep}}$ ) of amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP3.1–NP3.4). Experimental conditions and particle identification: see Fig. 5, except for BGEs: 106.6 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.0, ( $I = 100 \text{ mM}$ ), or diluted twice ( $I = 50 \text{ mM}$ ), or diluted ten times ( $I = 10 \text{ mM}$ ), or diluted 100 times ( $I = 1 \text{ mM}$ ). Dotted lines joining experimental points and directional arrows are just guides for the eyes. Each experimental point is the mean of three replicates and the error bars (not always visible)  $\text{SD} = \pm 1$ . Superimposed on figure (A) is the expected dependence of the electrophoretic mobility on  $\kappa a$  product for different values of  $\zeta$ -potential (isopotentials are materialized in dashed lines) obtained from interpolation of the exact numerical solutions of the transport equations proposed by Wiersema (case of a rigid, non-conducting sphere in a hypothetical 1:1 electrolyte with the arbitrarily chosen dimensionless ionic drag coefficients  $m_+ = m_- = 0.184$  at  $T = 25^\circ \text{C}$ ).

conductivity continuity (results not shown). However, we can assume that this variation results from particle sample heterogeneity in size, as related contribution to the mobility dispersion can be tuned by varying the electrolyte ionic strength, due to retardation forces described in the Overbeek–Booth theory [47, 48]. Indeed, for a given particle population, assuming a uniform surface charge density of these particles at a fixed electrolyte ionic strength (*i.e.* fixed  $\kappa$ ), the expected particle mobility dispersion related to particle size heterogeneity should be derived from the

slopes of the isopotential curves represented in Fig. 6A. Thus, and consistently with our experimental observations, it appears that mobility measurements (and hence mobility dispersions) would be less sensitive to particle size dispersion at the highest electrolyte ionic strength and lowest surface charge density, which both contribute to lower  $\zeta$ -potential values. Eventually, a levelling in particle mobility dispersion could be expected over further increases in ionic strength. In this case, the residual constant particle mobility dispersion would reveal the intrinsic particle sample heterogeneity in charge.

### 3.1.4 Influence of BGE pH

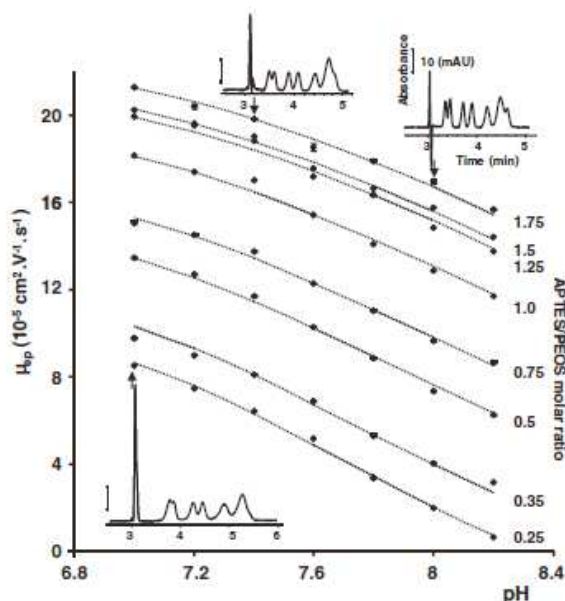
A preliminary study was performed in a 2–9 pH range, for the NP2 particle population (APTES/PEOS molar ratio 1:1), with BGEs of various composition but constant ionic strength (10 mM). The positive electrophoretic mobility exhibited by the particles remained rather constant in the pH range from 2 to 4, and then gradually decreased with a graphical extrapolation (see below for the model) leading to a zero  $\mu_{ep}$  for pH 11.

A deeper study was then performed on eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP4.1–NP4.8) of varying surface charge density (APTES/PEOS molar ratio varying from 0.25 to 1.75). As we aimed to highlight the influence of BGE pH on particle electrophoretic mobility, parameters such as co-ion nature, counter-ion nature and concentration as well as the overall electrolyte ionic strength were kept constant. Thus, the range of pH explored (from 7 to 8.2) was restricted at its lower limit by the buffering capacity of a Tris/HCl electrolyte with 100 mM ionic strength and at its higher limit by the dissolution of the particle silica shell. A general decrease in particle electrophoretic mobility (from 26 to 92% according to populations) was evidenced over increasing BGE pH from 7 to 8.2 as shown in Fig. 7. Considering populations of uniform particle size in electrolytes of fixed ionic strength (*i.e.*  $\kappa a$  product constant), the variation of their electrophoretic mobility  $\mu_{ep}$  in terms of pH should only be attributed to concomitant variations of their surface charge density at the shear plane due to variations of ionization degree of their amino groups introduced by APTES derivatization and residual silanol groups.

A two-site dissociation model was tested so as to fit the electrophoretic mobility data of Fig. 7 as a function of pH. This model relies on the assumption that: (i) the number of total ionizable functions,  $n_T$  (*i.e.* the sum of the number of amino and residual silanol groups,  $n_{\text{amino}}$  and  $n_{\text{silanol}}$ , respectively), remains constant; (ii) each of these two functions has a single  $pK_a$  value,  $pK_a^{\text{amino}}$  and  $pK_a^{\text{silica}}$ , respectively. For each function, the number of charged groups  $n(-\text{NH}_3^+)$  and  $n(-\text{O}^-)$ , for ionized amino groups and ionized silanol groups, respectively, can be expressed as:

$$n(-\text{NH}_3^+) = \frac{n_{\text{amino}}}{1 + 10^{p\text{H} - pK_a^{\text{amino}}}} \quad (3)$$

$$n(-\text{O}^-) = \frac{n_{\text{silanol}}}{1 + 10^{pK_a^{\text{silica}} - p\text{H}}} \quad (4)$$



**Figure 7.** Influence of BGE pH on the electrophoretic mobility of eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP4.1–NP4.8). Experimental conditions: see Fig. 3, except for hydrodynamic injection (50 mbar, 2 s), absorbance detection (200 nm), particle volume fraction (0.055%) and BGEs (all of 100 mM ionic strength): 106.6 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.0; 110.4 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.2; 116.5 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.4; 126.2 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.6; 141.6 mM Tris/100 mM HCl, pH 7.8; 165.9 mM Tris/100 mM HCl, pH 8.0; 204.4 mM Tris/100 mM HCl, pH 8.2. Each experimental point is the mean for three replicates and the error bars (not always visible) SD =  $\pm 1$ . Inserted electropherograms show the separation of the mixture of eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations, total particle volume fraction  $0.055 \times 8\%$ , for pH 7.0, 7.4, and 8.0. Dotted lines represent the plot of the two-site dissociation model proposed for the description of mobility variations.

The derivatized NPs effective mobility can then be written as follows:

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha \frac{1}{1 + 10^{p\text{H} - pK_a^{\text{amino}}}} \mu_{(-\text{NH}_3^+)} + (1 - \alpha) \times \frac{1}{1 + 10^{pK_a^{\text{silica}} - p\text{H}}} \mu_{(-\text{O}^-)} \quad (5)$$

where  $\alpha$  stands for the derivatization rate of initial silanol into amino groups ( $n(-\text{NH}_3^+)$  to  $n_T$  ratio) and  $\mu_{(-\text{NH}_3^+)}$  and  $\mu_{(-\text{O}^-)}$  stand for the limiting electrophoretic mobilities of NPs containing only fully ionized amino or silanol groups, respectively.

A curve fitting procedure was employed consisting in minimizing the mean quadratic deviation (defined as the average value of the squares of the deviations between experimental and calculated mobilities) for the eight mobility curves, by concurrent adjustment of variable parameters  $\mu_{(-\text{O}^-)}$ ,  $\mu_{(-\text{NH}_3^+)}$ ,  $pK_a^{\text{amino}}$ ,  $pK_a^{\text{silica}}$  and  $\alpha$ , using Excel solver. The adjusted parameter values giving rise to optimal fitting are summarized in Table 2. Under these conditions,

**Table 2.** Model parameters  $\mu_{(-O^-)}$ ,  $\mu_{(-NH_3^+)}$ ,  $pK_a^{\text{amino}}$ ,  $pK_a^{\text{silica}}$  and  $\alpha$  estimated by fitting experimental mobility data (as a function of pH) for amino/PEG-functionalized particle populations (APTES/PEOS molar ratio ranging from 0.25 to 1.75) to a two-site dissociation model (all mean quadratic deviations between experimental and calculated mobilities  $\leq 0.045 \text{ cm}^4 \text{ V}^{-2} \text{ s}^{-2}$  and average value of these mean quadratic deviations equal to  $0.023 \text{ cm}^4 \text{ V}^{-2} \text{ s}^{-2}$ )

APTES/PEOS molar ratio	Amino group density <sup>a)</sup> (eq nm <sup>-2</sup> )	$\alpha^{\text{b)}$	$\mu_{(-O^-)}^{\text{b)}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$\mu_{(-NH_3^+)}^{\text{b)}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$pK_a^{\text{silica}^{\text{b)}}$	$pK_a^{\text{amino}^{\text{b)}}$
0.25	0.31 (54)	0.32	-16.6	35.5	7.5	9.1
0.35	0.28 (34)	0.36				
0.5	0.48 (24)	0.44				
0.75	0.64 (21)	0.49				
1	0.85 (11)	0.56				
1.25	1.25 (10)	0.61				
1.5	1.35 (10)	0.62				
1.75	1.13 (27)	0.64				

a) As determined by ninhydrine colorimetric test, figures in parenthesis are RSD% ( $n = 3$ ).

b) Operating CE conditions: see Fig. 7.

estimated  $\mu_{(-O^-)}$  and  $\mu_{(-NH_3^+)}$  values were  $-16.6 \times 10^{-5}$  and  $35.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The  $\mu_{(-O^-)}$  should correspond to the electrophoretic mobility of NP1 at high pH (full dissociation of silanol groups). For comparison purposes, the electrophoretic mobility of this population was measured equal to  $-23.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in an electrolyte composed of 5.1 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /7.6 mM NaOH, 10 mM ionic strength (pH 6.9) at 25°C. In spite of the neutral pH conditions, this value is higher than the estimated  $\mu_{(-O^-)}$  value which is consistent with a measurement performed at much lower electrolyte ionic strength. On the other hand, the estimated  $\mu_{(-NH_3^+)}$  value is consistent with the fact that it should be higher than the experimental values for the particle population corresponding to the highest APTES/PEOS ratio (NP 4.8) namely  $21.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in an electrolyte composed of 106.6 mM Tris/100 mM HCl (100 mM ionic strength), pH 7.0. Concurrently, estimated  $pK_a^{\text{amino}}$  and  $pK_a^{\text{silica}}$  values were 9.1 and 7.5, respectively, which is in fair accordance with the current  $pK_a$  values for amino functions, but higher than expected as far as silanol groups are concerned (around 6 [49, 50]). As for the increase of the estimated  $\alpha$  values when the APTES/PEOS ratio increases, it is consistent with an increasing amount of amino groups attached on the NPs. A comment on the levelling off of  $\alpha$  at high APTES/PEOS molar ratios will be given later on in the discussion (Section 3.2).

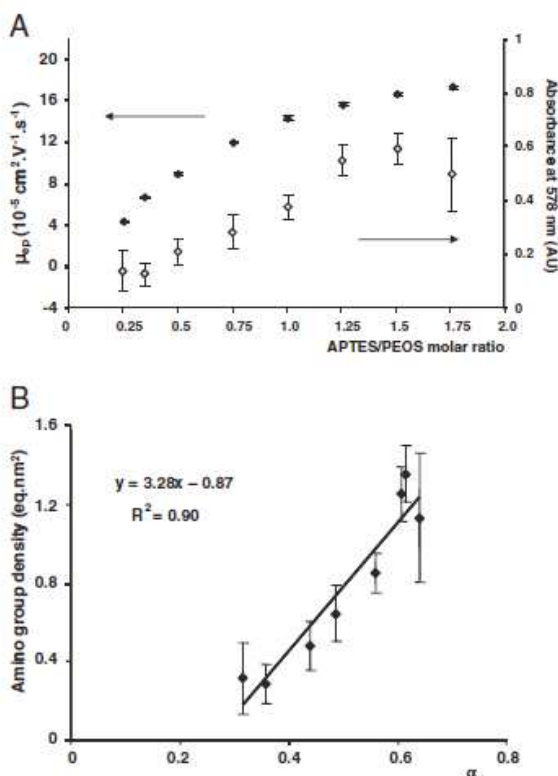
Considering the influence of pH in the range of from 7.0 to 8.0 on the separation of a mixture of the eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations, a strong increase in resolution was observed as can be seen from the inserted electropherograms in Fig. 7. For the sake of an example, (i) the effective selectivity for the particle population pair NP4.3/NP4.4 increased linearly by about 12% on going from pH 7.0 to pH 8.0; (ii) peak efficiency remained constant from pH 7.0 to 7.6, and then doubled from pH 7.6 to 8.0, resulting in a resolution increase of about 50% on going from pH 7.0 to 8.0. It has to be noticed that, around pH 7.0, the three particle populations NP4.6, NP4.7, and NP4.8 comigrated, resulting in a single asymmetric peak,

and around pH 8.0, started to separate, resulting in two partially resolved peaks. Eventually, we noticed a decreasing resolution for pH values higher than 8.0. From the exact numerical solutions of Eq. (5) for arbitrarily chosen pH values, and using previously determined parameters  $\mu_{(-O^-)}$ ,  $\mu_{(-NH_3^+)}$ ,  $pK_a^{\text{amino}}$ ,  $pK_a^{\text{silica}}$ , we evidenced that maximum mobility difference between two particle populations of different surface charge densities should be reached for pH 8.1 (whatever the  $\alpha$  values). This could partially explain the maximum in resolution determined around pH 8.0.

### 3.2 Quantitation of the effective number of attached amino groups on particle surface

To quantify the effective number of amino groups attached to particle surface, a ninhydrine colorimetric test protocol derived from Kaiser's original description [43] was performed on particle samples. Particle dispersion in a Tris buffer was not compatible with this colorimetric test protocol, as it contains primary amines and would thus induce a background signal. In this context, synthesized core/shell particles were dispersed in a MOPS buffer (100 mM ionic strength), pH 7.4, and a linear relationship (in accordance with Eq. (5)) was verified between the particle mobility values that were measured from this point in a MOPS buffer and the  $\alpha$  values previously determined in Tris buffers. Under these conditions, Fig. 8A shows the absorbance responses to the ninhydrine colorimetric test obtained for eight amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP5.1–NP5.8). An increase in the absorbance response over increasing the APTES/PEOS molar ratio reveals an increasing number of titrated amino groups originating from particle surface. However, high RSD values were obtained for these measurements (RSD up to 54%), as it can be seen from the error bars in Fig. 8A. This can be explained by the inherent experimental difficulties linked to the ninhydrine colorimetric test protocol that is the sampling of small volumes of viscous reagent solutions, and a chemical reaction the yield of which may be affected not only by many experimental factors such as





**Figure 8.** (A) Influence of APTES/PEOS molar ratio on electrophoretic mobility (filled diamonds) and absorbance measured at 578 nm (open diamonds) as a response to the ninhydrine colorimetric test for 8 amino/PEG-functionalized core/shell particle populations (NP5.1 to NP5.8). Experimental CE conditions: see Fig. 3. Experimental conditions for the ninhydrine colorimetric test: see Section 2. Each experimental point is the mean of 4 and 3 replicates for mobility and absorbance measurements, respectively, and the error bars stand for  $\pm$  one standard deviation. (B) Plot of the calculated amino group density on derivatized core/shell particles (calculated from the ninhydrine colorimetric test data) in terms of the derivatization rate of initial silanol into amino groups  $\alpha$  (values from Table 2). Experimental conditions: see Fig. 8A.

the heating time or even the bath temperature, but also by the unusual biphasic system. Thus, differences in absorbance levels appeared to be insignificant for the three higher APTES/PEOS molar ratios. It is to be mentioned that no lack of reactant can be blamed for as ninhydrine was introduced in large excess. Amino group densities ( $\text{equivalent}/\text{nm}^2$ ) on derivatized core/shell particles derived from the absorbance responses to the ninhydrine colorimetric test are summarized in Table 2. Concerning CE experiments, a monotonous increase in mobility was evidenced over increasing the APTES/PEOS molar ratio (Fig. 8A), which is consistent with the increasing amount of amino groups determined by the ninhydrin colorimetric test. Moreover, it is worth noting that much lower RSD values ( $\leq 1.5\%$ ) were obtained on mobility than on absorbance measurements. It is also to be noted that a levelling off in mobility values occurs at the higher APTES/PEOS molar ratios,

consistently with the one observed for absorbance measurements. This tendency can be explained by a saturation of the particle surface by the amino groups, due to a decrease in reactivity of the silane reagent at the highest concentration. In addition to this, on analogy with the behavior of polyelectrolytes [51, 52], possible concomitant charge condensation effects may occur. Indeed, for the three highest APTES/PEOS molar ratios, the mean distance between charges can be estimated to 0.9 nm (using data of Table 2), which is close to the value of Bjerrum length for water at 25°C, 0.7 nm. Figure 8B shows the correlation between particle amino group charge densities derived from ninhydrine colorimetric test and derivatization rates of silanol into amino groups,  $\alpha$ , estimated previously from the two-site dissociation model (Table 2). A fairly linear relationship was observed between both parameters ( $R^2 = 0.90$ ), which indicates that the two-site dissociation model proposed can provide a good approximation. However, the y-intercept different from zero indicates either an underestimation of the amino group density by the ninhydrine colorimetric test or an overestimation of  $\alpha$  values. This may arise from: (i) an overestimation of the effective extinction coefficient for the colored product of the reaction between the ninhydrine and the amino groups attached to particle surface, when assimilated to the one of propylamine; (ii) a retention of the anionic blue chromophore of the ninhydrine reaction to the particles bearing cationic groups [44]; (iii) an approximation in considering NP1 as a blank sample; and (iv) an increase in the number of total ionizable sites,  $n_T$ , of the silica shell upon increasing APTES/PEOS molar ratio at constant PEOS concentration, due to a competitive effect between the two silanes. At this stage, the present results are nevertheless in favor of a direct, although relative, determination of the particle surface charge density, employing electrophoretic mobility measurements.

#### 4 Concluding remarks

CE has proved to be an effective method for the charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell NPs. A charge-dependent electrophoretic mobility was demonstrated and best resolutions were obtained at pH 8.0, high ionic strength (*ca.* 100 mM) and low total particle volume fraction (*ca.* 0.055%), for which negligible interference effects were highlighted between different particle populations in mixtures. A ninhydrine colorimetric test protocol was performed to determine the amino group density on the surface of bifunctional maghemite/silica core/shell NPs. Thereafter, a correlation between this amino group density and the derivatization rate of silanol into amino groups derived from electrophoretic mobility measurements was demonstrated. In conclusion, CE appears as an easy, fast, and reliable method for the determination of NP-effective surface charge densities. In view of the development of an immunodiagnostic, the characterization of these bifunctional particles will further allow the selection of the appropriate batches for subsequent coating with an antibody or an antigen.

The authors thank the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, France), for financial support of project SOLUDIAG. They also thank Dr. Jérôme Vial (Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, UMR 7121 CNRS-ESPCI, Paris, France) for fruitful discussions.

The authors have declared no conflict of interest.

## 5 References

- [1] Zhao, M., Beauregard, D. A., Loizou, L., Davletov, B., Brindle, K. M., *Nat. Med.* 2001, 7, 1241–1244.
- [2] Ito, A., Hayashida, M., Honda, H., Hata, K., Kagami, H., Ueda, M., Kobayashi, T., *Tissue Eng.* 2004, 10, 873–880.
- [3] Shinkai, M., Wang, J., Kamihira, M., Iwata, M., Honda, H., Kobayashi, T., et al., *J. Ferment. Bioeng.* 1992, 73, 166–168.
- [4] Wada, S., Tazawa, K., Furuta, I., Nagae, H., *Oral Dis.* 2003, 9, 218–223.
- [5] Gallo, J. M., Varkonyi, P., Hassan, E. E., Grootthuis, D. R., *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1993, 21, 575–592.
- [6] Safarik, I., Safarokova, M., *Biomagn. Res. Technol.* 2004, 2, 7–34.
- [7] Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J., Uhlén, M., *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, 7, 43–54.
- [8] Gupta, A. K., Gupta, M., *Biomaterials* 2005, 26, 3995–4021.
- [9] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R. N., *Chem. Rev.* 2008, 108, 2064–2110.
- [10] Woodward, R. C., Heeris, J., St. Pierre, T. G., Saunders, M., Gilbert, E. P., Rutnakompituk, M., Zhang, Q., Riffle, J. S., *J. Appl. Cryst.* 2007, 40, 495–500.
- [11] Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K. V., Muhammed, M., *Magn. Magn. Mater.* 2001, 225, 30.
- [12] Holoubek, J., *J. Quant. Spectrosc. Ra.* 2007, 106, 104–121.
- [13] De Jaeger, N., Demeyere, H., Finsy, R., Sneyers, R., Vanderdeelen, J., van der Meeren, P., van Laethem, M., *Part. Part. Syst. Charact.* 1991, 8, 179.
- [14] Di Marco, M., Guilbert, I., Port, M., Robic, C., Couvreur, P., Dubernet, C., *Int. J. Pharm.* 2007, 331, 197–203.
- [15] Hunter, R. J., *Foundations of Colloid Science*, 2nd Edn., Oxford University Press, New York, 2001.
- [16] Radko, S. P., Chrambach, A., *Electrophoresis* 2002, 23, 1957–1972.
- [17] Rodríguez, M. A., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. B* 2004, 800, 7–25.
- [18] VanOrman, B. B., McIntire, G. L., *J. Microcol. Sep.* 1989, 1, 289–293.
- [19] Jones, H. K., Ballou, N. E., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2484–2490.
- [20] Petersen, S. L., Ballou, N. E., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1676–1681.
- [21] Fourest, B., Hakem, N., Perrone, J., Guillaumont, R., *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 1996, 208, 309–318.
- [22] Radko, S. P., Stastna, M., Chrambach, A., *Electrophoresis* 2000, 21, 3585–3592.
- [23] Vanifatova, N. G., Spivakov, B. Y., Mattusch, J., Wennrich, R., *J. Chromatogr. A* 2000, 898, 257–263.
- [24] Vanhoenacker, G., Goris, L., Sandra, P., *Electrophoresis* 2001, 22, 2490–2494.
- [25] Stokes, J. C., Johnson, M. E., *Microchem. J.* 2004, 76, 121–129.
- [26] Mc Cormick, R. M., *J. Liq. Chromatogr.* 1991, 14, 939–952.
- [27] Quang, C., Petersen, S. L., Ducatte, G. R., Ballou, N. E., *J. Chromatogr. A* 1996, 732, 377–384.
- [28] Ducatte, G. R., Ballou, N. E., Quang, C., Petersen, S. L., *J. Microcol. Sep.* 1996, 8, 403–412.
- [29] Petersen, S. L., Ballou, N. E., *J. Chromatogr. A* 1999, 834, 445–452.
- [30] Vanifatova, N. G., Spivakov, B. Y., Mattusch, J., Wennrich, R., *Talanta* 2003, 59, 345–353.
- [31] Morneau, A., Pillai, V., Shalini, N., Winnik, F. M., Ziolo, R. F., *Colloids Surf.* 1999, 154, 295–301.
- [32] Wang, F.-H., Yoshitake, T., Kim, D.-K., Muhammed, M., Bjelke, B., Kehr, J., *J. Nanopart. Res.* 2003, 5, 137–146.
- [33] Templeton, A. C., Cliffler, D. E., Murray, R. W., *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 7081–7089.
- [34] VanOrman Huff, B., McIntire, G., *J. Microcol. Sep.* 1994, 6, 591–594.
- [35] Křivánková, L., Pantůčková, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2000, 21, 627–632.
- [36] Wei, G.-T., Wang, C.-R. C., Liu, F.-K., Chang, S.-S., *J. Chin. Chem. Soc.* 1998, 45, 47–52.
- [37] Okamoto, Y., Kitagawa, F., Otsuka, K., *Electrophoresis* 2006, 27, 1031–1040.
- [38] d'Orlyé, F., Varenne, A., Gareil, P., *Electrophoresis* 2008, 29, 3768–3778.
- [39] Massart, R., *IEEE Trans. Magn.* 1981, 17, 1247–1248.
- [40] Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J. N., *Progr. Colloid. Polym. Sci.* 1996, 100, 212–216.
- [41] Maurice, V., Georgelin, T., Siaugue, J.-M., Cabuil, V., *J. Magn. Magn. Mat.* 2009 321, 1408–1413.
- [42] Melanson, J. E., Baryla, N. E., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4110–4114.
- [43] Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., *Anal. Biochem.* 1970, 34, 595–598.
- [44] Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., Merrified, R. B., *Anal. Biochem.* 1981, 117, 147–157.
- [45] Wiersema, P. H., Loeb, A., Overbeek, J. Th. G., *J. Colloid Interface Sci.* 1966, 22, 78–99.
- [46] Lelièvre, F., Gareil, P., Jardy, A., *Anal. Chem.* 1997, 69, 385–392.
- [47] Overbeek, J. Th. G., *Kolloide Beihefte* 1943, 54, 287–364.
- [48] Booth, F., *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A* 1950, 203, 514–533.
- [49] Schwer, C., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1801–1807.
- [50] Sánchez Muñoz, O. L., Hernández, E. P., Lämmerhofer, M., Lindner, W., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2003, 24, 390–398.
- [51] Manning, G. S., *J. Chem. Phys.* 1981, 85, 1506–1515.
- [52] Cottet, H., Gareil, P., Theodoly, O., Williams, C. E., *Electrophoresis*, 2000, 21, 3529–3540.

## **Annexe 6 : Traitement de surface du PDMS**

### **Protocole pour le traitement au PDMA-AGE :**

- Passer le bloc de PDMS pendant 30 s au plasma cleaner à O<sub>2</sub>
- Juste après le passage au plasma d'O<sub>2</sub>, activer le canal avec de la soude 1M pendant 15min à 20μL/h
- Injecter ensuite une solution à 0,1% (m/v) de PDMA AGE, laisser à débit nul pendant 30min à l'abri de la lumière
- Retirer la solution de polymère par pression
- rincer à l'eau distillée

**Annexe 7 : Spectres Infrarouge pour évaluer la présence du PDMA-AGE**