

Immunodiagnostic par agglutination magnétique

Julie Görge

▶ **To cite this version:**

Julie Görge. Immunodiagnostic par agglutination magnétique. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00610317

HAL Id: pastel-00610317
https://pastel.hal.science/pastel-00610317

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 Paris VI

École doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre

Présentée par :

Julie GÖRGE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse :

Immunodiagnostic par agglutination magnétique

Soutenue publiquement le 4 mai 2011 devant le jury composé de :

Mme	Valérie CABUIL	Présidente du jury
Mme	Eliane SOUTEYRAND	Rapporteur
M.	Martin GIJS	Rapporteur
M.	Julien VALLAYER	Encadrant
M.	Jean BAUDRY	Co-Directeur de thèse
M.	Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse

A mes Parents et Aurélie

Remerciements

Je remercie Jérôme de m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai aimé son enthousiasme, son expertise scientifique et l'autonomie qu'il m'a accordé. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité et ses conseils aussi bien professionnels que personnels.

Je remercie Jean pour la qualité de son encadrement, pour toutes les connaissances qu'il a partagé avec moi, et pour son soutien quotidien. Grâce à lui, j'ai découvert une nouvelle façon d'aborder les sciences.

Je remercie Julien pour son professionnalisme, pour sa confiance et sa patience. J'ai apprécié débuter dans le monde industriel sous sa direction.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres de mon jury : Valérie Cabuil pour m'avoir fait l'honneur de le présider, Eliane Souteyrand et Martin Gijs pour avoir accepté de rapporter ce travail.

J'ai également pu effectuer cette thèse grâce à Valérie Cabuil, je tiens à la remercier pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire PECSA.

Je remercie également tous les partenaires européens impliqués dans le projet DetectHIV : Katholieke Universiteit Leuven, Ayanda Biosystems, Denmark Technical University, Ademtech, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne et Bertin Technologies. Ce fût très enrichissant de rencontrer des scientifiques de domaines variés. Je remercie particulièrement Michael Mockey, Thomas Lehnert pour sa compréhension au niveau des délais des rapports, Yves Moser pour sa formation à la microfluidique, Thomas Glasdam Jensen pour sa patience concernant les nombreuses questions d'optique.

Une partie de ce travail a été réalisée à Bertin Technologies. Je remercie toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'intégration du démonstrateur. Merci à Patrick Gasse, Luc Lotteau, Paulo Ferreira, Elodie Brient-Litzler, Eric Compain et Julien Charpentier.

Merci aux stagiaires pour leur application et implication : Hélène Gouthière, Camille Provost, Marina Gonzalez Bronzatti et Donatien Lefebvre de Rieux.

Merci à Florence Condamine pour son travail et pour le temps que nous avons

passé ensemble.

Je remercie tout le laboratoire du LCMD pour les instants partagés.

Merci à mes amis et à ma famille.

Table des matières

1 Introduction générale **1**

2 Tests immunologiques : principe et développement **5**

2.1 Les anticorps et leur application au diagnostic 6

2.1.1 Structure générale 6

2.1.2 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux 8

2.1.3 Les différents formats de tests 10

2.1.4 Etat de l'art 16

2.1.5 Les principaux problèmes engendrés par l'utilisation d'anticorps 17

2.2 Le diagnostic au LCMD 21

2.2.1 Présentation 21

2.2.2 Rôle de la diffusion 26

2.2.3 Dosage 30

2.2.4 Conclusion 32

2.3 Les tests présents et futurs 33

2.3.1 Tests commercialisés 34

2.3.2 Tests en cours de commercialisation 37

2.3.3 Tests en développement 49

2.4 Conclusion 58

3 La sensibilité du test d'agglutination magnétique : compréhension et amélioration **59**

3.1 Les facteurs de la sensibilité 60

3.1.1 Le bruit . . . 62
3.1.2 La pente de la droite . . . 68
3.1.3 Conclusion . . . 86
3.2 De la mesure moyenne au comptage individuel . . . 87
3.2.1 Protocole . . . 90
3.2.2 Résultats . . . 94
3.2.3 Caractérisation . . . 96
3.2.4 Discussions . . . 102
3.3 Conclusion . . . 103

4 Un nouveau format fluidique pour de meilleures performances 105
4.1 Introduction . . . 105
4.1.1 Premier dimensionnement . . . 106
4.1.2 Deuxième dimensionnement . . . 108
4.2 Système de préconcentration . . . 111
4.2.1 Fonctionnement . . . 111
4.2.2 Montage magnétique et microfluidique . . . 111
4.2.3 Résultat . . . 113
4.3 Couplage avec la cytométrie en flux . . . 115
4.3.1 Validation des principes . . . 115
4.3.2 La détection . . . 119
4.4 Conclusion . . . 123

5 Elaboration d'un test de diagnostic 125
5.1 Choix des matériaux et du protocole de fabrication de la puce intégrée 127
5.1.1 Choix de matériaux . . . 127
5.1.2 Fabrication de la puce intégrée . . . 130
5.2 Définition de la puce intégrée . . . 132
5.2.1 Enjeu de l'intégration : manipulation fluidique . . . 132
5.2.2 Dimensionnement de la puce . . . 133
5.2.3 Conception/Plan/Schéma . . . 135
5.2.4 Résultat de l'intégration : la puce unique . . . 137

5.3 Stratégie pour l'intégration 138
5.3.1 Thermalisation 138
5.3.2 Calibration du protocole 140
5.3.3 Protocole magnétique 141
5.3.4 Partie optique 148
5.4 Conclusion 153

6 Conclusion **155**

Chapitre 1

Introduction générale

Le diagnostic in-vitro (IVD) regroupe toutes les techniques, les appareils ou les dispositifs utilisés au cours de tests médicaux pour analyser des échantillons de tissus ou de fluides issus du corps humain. Dans les années à venir, ce marché est amené à croître fortement. Tous les acteurs de la santé reconnaissent en effet que les tests jouent un rôle stratégique dans l'amélioration des coûts et de la qualité des soins, grâce à des diagnostics plus précoces et plus précis et un suivi constant du patient [1]. En France, en juillet 2010, les examens biologiques conditionnaient 46 % des dépenses de santé pour un coût de 2 % [2]. Une grande variété de maladies se caractérise par un changement de concentration d'une protéine dans les fluides physiologiques du patient. Ces maladies couvrent les infections de type virale, par exemple le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), bactérienne (staphylococcus doré), parasitaire (malaria) et les maladies non contagieuses (cancer). Le graal du diagnostic est un test très sensible, simple, rapide, transportable, robuste et bon marché.

Dans les années 50, le dosage des protéines portait principalement sur les propriétés des acides aminés en terme d'absorption ou de formation de complexe spécifique en présence de certains agents tels que le cuivre pour les méthodes du biuret et de Lowry, d'acide méthanolique pour la méthode du bleu de Coomassie. Ces tests étaient rapides, peu sélectifs et assez peu sensibles (μmol) en raison des nombreuses protéines interférantes présentes en solution. Les méthodes en-

zymatiques et biologiques, plus sélectives se sont ensuite imposées. Aujourd'hui, la technique immunologique est la plus répandue pour détecter des peptides, des molécules (haptènes, hormones, drogues ...) dans les fluides biologiques. Elle s'appuie sur la reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps, technique utilisée par notre système immunitaire.

La réponse immunitaire, commune à tous les mammifères, est spécifique et complète les mécanismes de défense non-spécifique ou innée comme la protection de la peau et des muqueuses, l'acidité gastrique ou les larmes. Ces deux systèmes - spécifique et non-spécifique - permettent de nous protéger contre tous les envahisseurs extérieurs (virus, bactéries et autre agents pathogènes présents dans l'air, l'eau, la nourriture...) mais aussi contre les cellules anormales (parfois sources de cancer) qui apparaissent régulièrement dans notre organisme. Le système immunitaire a donc pour rôle de discriminer le soi du non-soi et de détruire tout ce qui est reconnu comme étranger. Ses principales caractéristiques sont :

- la spécificité
- la diversité
- la reconnaissance du soi et du non-soi
- la mémoire

La spécificité est une des caractéristiques essentielles des tests de diagnostic. Elle provient de la faculté de notre organisme à produire des protéines - les anticorps - spécialement dirigés vers un corps étranger appelé antigène, s'il entraine une réponse immunitaire. La sensibilité, quant à elle, est fixée par le protocole utilisé pour révéler cette association antigène-anticorps c'est à dire sa capacité à associer un signal mesurable pour chaque complexe. Afin de faciliter cette détection, les tests immunologiques mettent très souvent en jeu une double reconnaissance spécifique basée sur la formation d'un "sandwich". Un premier anticorps, spécifique à un site de l'analyte cible, capture cet analyte en solution et un deuxième anticorps, reconnaissant une autre région, révèle la capture. Cette technique suppose la présence sur la molécule de deux sites de reconnaissance suffisamment éloignés pour fixer les deux anticorps (figure 1.1).

La détection de la formation d'un complexe immun se fait selon diverses mé-

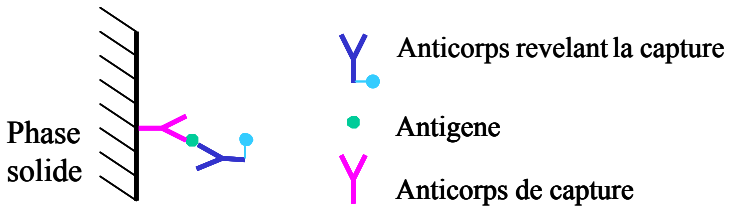


FIGURE 1.1 – Représentation schématique d'un "sandwich" d'anticorps pour révéler la présence d'antigène. Un anticorps est fixé à une surface solide.

thodes : optique, magnétique, électrique..., suivant des protocoles et des appareillages plus ou moins complexes accédant à des seuils de détection allant de la nanomole, facilement accessible, à la femtomole, pour les plus sensibles.

La reconnaissance d'un antigène par un anticorps est en général très sensible mais grandement soumise à la diffusion des espèces. A très faible concentration en analyte, ce temps de transport devient limitant. Dans les années 90, une première révolution, aujourd'hui commercialisée, a consisté à utiliser des colloïdes, telles que les billes de silice par exemple, pour accélérer ce temps. Une deuxième évolution se prépare dans les laboratoires de recherche basée sur la présence de flux. Il s'agit très souvent de systèmes microfluidiques dans lesquels l'échantillon est envoyé directement sur les anticorps (flux laminaire). Ces systèmes offrent de plus, l'avantage de travailler avec de très faibles quantités de réactifs (μL) - réduisant ainsi le coût d'analyse - et d'être automatisable [3]. Ces dispositifs se développent beaucoup ces dernières années.

On peut également noter une nouvelle orientation des recherches autour de la nature de la cible. Il s'agit de la détection d'ADN via les tests d'amplification génique in-vitro avec la technique d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR [4] et la détection de nouvelles cibles grâce à la synthèse de nouveaux anticorps impossible à obtenir par simple injection de l'antigène sur un animal en raison de la forte toxicité de l'antigène [5, 6].

L'un des enjeux du diagnostic à savoir une détection très sensible (autour de la femtomole) est en grande partie aujourd'hui atteinte. Les travaux de recherche se tournent maintenant vers la simplification des tests.

Il s'agit d'enjeux scientifiques mais également technologiques pour concevoir un test très sensible, simple, rapide, transportable, robuste et bon marché. A travers une approche de physico-chimiste et d'industriel, nous allons chercher à améliorer la sensibilité d'un test d'agglutination magnétique. Cette recherche va nous conduire à un nouveau format fluidique et à l'intégration complète de briques technologiques en vue d'un test fonctionnel.

Dans une première partie, "Tests immunologiques : principe et développement" nous détaillons les anticorps et leur application au diagnostic puis nous présentons le test d'agglutination magnétique développé au laboratoire LCMD et enfin nous essayons de dresser les paysages actuel et futur des tests de diagnostic.

Dans une seconde partie "La sensibilité du test d'agglutination magnétique : compréhension et amélioration", nous nous attachons à la compréhension de la sensibilité du test mis au point au laboratoire LCMD en vue de son amélioration.

Ce travail nous amène à reconsidérer la cinétique du test car une grande sensibilité ne doit pas être au détriment d'un long temps d'analyse. Ainsi, un nouveau système fluidique est développé dans une troisième partie "Un nouveau format fluidique pour de meilleures performances ". Cette partie s'inscrit dans le cadre d'un projet européen, DetectHIV, dans lequel quatre partenaires universitaires (EPFL, DTU, KUL et l'ESPCI) et trois partenaires industriels (Ayanda Biosystems, Ademtech et Bertin Technologies) sont intervenus. Ce projet consistait à détecter une très faible quantité de protéine, en l'occurrence une protéine du virus du VIH en un temps très court. Pour cela, un système microfluidique complètement intégré a été réalisé. La conception de cet appareil fait l'objet de notre dernière partie " Elaboration d'un test de diagnostic".

Chapitre 2

Tests immunologiques : principe et développement

La détection et la quantification sélective d'une protéine parmi d'autres constituants d'un échantillon sont les objectifs des tests de diagnostic. Ils doivent être quantitatifs, fiables et sensibles. Grâce à la grande sélectivité et à la grande affinité de l'interaction antigène-anticorps, les tests immunologiques sont les tests les plus répandus dans le monde du diagnostic. Ces tests se heurtent à des problèmes purement immunologiques concernant le choix de l'anticorps, de son affinité intrinsèque avec la protéine cible et des problèmes physicochimiques pour déceler la formation du complexe immun.

Dans ce chapitre introductif, nous nous attacherons, tout d'abord, à la description de l'anticorps et de son application au diagnostic. Ensuite, nous présenterons le test mis au point au laboratoire basé sur cette reconnaissance spécifique utilisant des billes magnétiques. Enfin, nous essayerons de décrire le paysage actuel et futur du diagnostic à travers des exemples jugés représentatifs.

2.1 Les anticorps et leur application au diagnostic

Les anticorps sont des molécules complexes, appartenant à la famille des immunoglobulines (ce qui explique que l'abréviation courante d'anticorps soit Ig) communes à tous les vertébrés. Ils sont fabriqués par les plasmocytes, des lymphocytes B activés [7]. Les anticorps ont une seule fonction : reconnaitre et se fixer de façon spécifique à une molécule nommée antigène.

2.1.1 Structure générale

Ils sont formés de 4 chaînes polypeptidiques ; de poids moléculaire 150.000 g.mol^{-1} : 2 chaînes lourdes (H pour heavy de 50.000 g.mol^{-1} chacune) et 2 chaînes légères (L pour light de 25.000 g.mol^{-1} chacune) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures. Ces ponts disulfures se trouvent aux extrémités des chaines lourdes et légères de l'anticorps, lui conférant ainsi une grande fléxibilité. L'ensemble est donc, malgré sa taille élevée, très déformable, ce qui facilite la reconnaissance. Ces chaînes forment une structure en Y et sont constituées de domaines immunoglobulines de 110 acides aminés environ. Chaque chaîne légère

est constituée d'un domaine constant (C) et d'un domaine variable (V). Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères (figure 2.1).

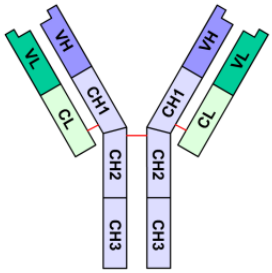


Figure 2.1 – Représentation schématique de la structure d'un anticorps

Domaine constant

Les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre, caractéristiques de l'espèce et de la classe de l'immunoglobuline. Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté CL. Les chaînes lourdes comportent, selon la classe de l'anticorps, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 et CH4. Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans l'activation du système immunitaire. Ces parties seront également utilisées lors du greffage de l'anticorps sur les surfaces ; étape détaillée dans la partie suivante.

Domaine variable

Un anticorps possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (VH) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (VL) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène. Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras. Ces deux sites sont identiques d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps.

2.1.2 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Un agent pathogène (bactérie, virus, etc.) est reconnu par le système immunitaire par l'intermédiaire d'antigènes. On appelle antigène toute macromolécule reconnue par des anticorps et capable d'engendrer une réponse immunitaire. Un antigène possède généralement plusieurs sites de liaison aux anticorps, appelés épitopes (figure 2.2). Pour un même antigène, on peut classer une population d'anticorps selon sa capacité à reconnaître un seul ou plusieurs épitopes. On parle alors respectivement d'anticorps monoclonaux et polyclonaux. Ces anticorps sont produits par les mêmes cellules : les lymphocytes B. La différence réside dans le tri de ces lymphocytes B. Le choix des anticorps est primordial à la réussite d'un test car il est à l'origine de la détection.

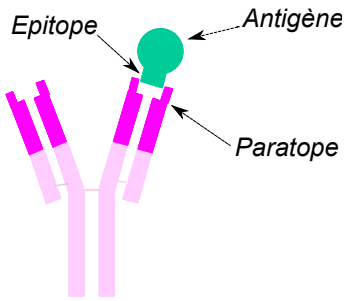


Figure 2.2 – Schéma de la reconnaissance entre un anticorps (site réactif appelé paratope) et un antigène (site réactif appelé épitope)

Production des anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux portent ce nom car ils sont produits par différents lymphocytes B. Un lymphocyte B synthétise un seul type d'anticorps, déterminé par des réarrangements chromosomiques effectués au hasard pendant l'hématopoïèse. Quand un lymphocyte B reconnait l'antigène qui correspond à son anticorps, il va se diviser et les cellules filles vont se différencier en plasmocytes qui vont synthétiser l'anticorps. L'antigène à reconnaitre est injecté à l'animal. Il porte plusieurs épitopes, plusieurs lymphocytes B vont donc le reconnaitre et se diviser.

Après quelques semaines, une prise de sang va permettre de récupérer le sérum contenant les anticorps synthétisés. Ils sont donc la production de plusieurs clones différents, d'où le nom de polyclonal.

La technique polyclonale présente un certain nombre d'inconvénients : le sérum contient des anticorps dirigés contre la protéine à reconnaitre, mais aussi d'autres qui peuvent entrainer un parasitage du marquage. Par ailleurs, le type exact des anticorps produit par un lymphocyte est le fruit du hasard (présence d'IgG et IgM). D'un animal à l'autre, les anticorps résultant d'un même protocole d'immunisation peuvent être différents et les résultats être partiellement non reproductibles. Il n'est pas rare que la mort de l'animal entraine la disparition d'un anticorps polyclonal très efficace dont aucun équivalent ne pourra être retrouvé plus tard. De plus, la production du sérum par un seul animal limite sa diffusion. Enfin, la nécessité de prendre le sérum directement sur l'animal oblige à choisir des animaux de grande taille pour avoir une production suffisante. Le suivi de production d'un anticorps polyclonal est donc impossible. En revanche ces anticorps sont extrêmement sensibles en raison du nombre important d'épitopes reconnus sur un seul antigène.

Production des anticorps monoclonaux

Ils résolvent les inconvénients des anticorps polyclonaux. Ils sont en effet fabriqués par un seul clone de lymphocyte B. Ils sont donc tous identiques et reconnaissent un seul épitope. Ils gagnent donc en précision ce qu'ils perdent en sensibilité. A la fin des années 1970, César Milstein et Georges Köhler ont développé la technique des hybridomes [7] permettant la fabrication d'importants volumes d'anticorps monoclonaux très purs par culture cellulaire. Cette découverte permit des avancées considérables dans le domaine du diagnostic. Depuis 25 ans, des efforts très importants ont été consentis, pour générer par ingénierie moléculaire des anticorps de seconde génération ayant de meilleures affinités, une immunogénicité réduite - diminuant le risque de reconnaissance non spécifique dans le cadre des tests de diagnostic - et une stabilité accrue [5]. La sensibilité des tests s'est donc nettement améliorée.

La première étape est la production d'un sérum polyclonal par la méthode précédente. Les plasmocytes sont récupérés et sont alors fusionnés in vitro avec des myélomes, qui sont des cellules tumorales ayant la propriété de se multiplier indéfiniment. La cellule hybride obtenue (dite « hybridome ») est sélectionnée puis multipliée dans un milieu de culture approprié et enfin purifiée.

Ces anticorps peuvent être très sélectifs, sensibles à une modification structurelle de l'antigène due à un changement d'acide aminé, d'état d'oxydation ou de stéréoisomérie. Le choix initial de l'antigène injecté chez l'animal est primordial car il conditionne la spécificité de l'anticorps. Le choix de l'anticorps est également important car il est fonction de la technique utilisée. En effet, les anticorps utilisés pour les tests d'immunohistochimie, de bloquage immunologique (immunoblotting) ou de tri cellulaire avec un cytomètre de flux peuvent ne pas fonctionner pour les tests immunologiques. Ceci s'explique par la différence de la nature de l'échantillon, de la configuration de l'antigène - native, pour les anticorps conformationels ou dénaturés, pour les anticorps reconnaissant un épitope linéaire (enchainement d'acides aminés)- ou de son aspect libre ou lié à un composant du milieu.

Un test de diagnostic a pour but de détecter la présence d'un analyte dans un milieu complexe. Cet analyte peut être une protéine, une hormone, un médicament, un peptide ou bien un acide nucléique. Dans cette partie, nous nous intéressons uniquement aux tests immunologiques. L'un des enjeux des tests immunologiques est d'associer un signal mesurable à chaque association spécifique anticorps-analyte (que l'on nommera antigène).

2.1.3 Les différents formats de tests

Les tests immunologiques se déroulent, soit en phase homogène où les antigènes liés et non liés à l'anticorps sont présents dans le milieu réactionnel lors de la mesure, soit en phase hétérogène où des étapes de lavage sont réalisées avant détection. Ces deux formats vont être présentés à l'aide de deux exemples historiques. Ces exemples s'appuient sur une mesure directe de l'antigène tout comme notre test d'agglutination qui sera détaillé dans la deuxième partie de ce chapitre. Les tests compétitifs seront ensuite présentés. Ces tests ont l'avantage de pouvoir

doser des antigènes de très petites tailles contrairement aux tests précédents dits "directs".

Phase homogène

La phase homogène est l'ancêtre des tests immunologiques. Dans les années 20, un simple test d'agglutination permettait de détecter le Bacille de Koch, bactérie responsable de la tuberculose. Le sérum du patient était mélangé à un échantillon sanguin de mouton contenant des anticorps spécifiques à la bactérie. Après quelques minutes, des agrégats, issus de la formation de complexes immuns, apparaissaient et étaient détectés par une simple mesure d'absorbance [8]. Dans les conditions de Rayleigh où la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules, la lumière diffusée par un objet est proportionnelle au carré de son volume. Ainsi, un agrégat diffuse plus la lumière que des anticorps libres. Afin d'obtenir une variation de signal mesurable, les agrégats doivent être suffisamment "gros" c'est à dire compris entre 50 et 100 nm (équivalant à 5-10 anticorps par complexe) [7]. Le temps de rencontre des entités et la taille minimale à atteindre pour détecter les complexes régissent le temps de ce test. Dans les années 1960, l'intensité de lumière diffusée par ces agrégats spécifiques d'antigène-anticorps a été amplifiée avec l'utilisation de billes [9]. Ces billes étaient principalement des billes de latex car leur protocole de synthèse était bien maitrisé, aboutissant à des particules très monodisperses et leur fonctionnalisation facile pour le greffage d'anticorps. Typiquement, cette technique permet de détecter des concentrations en analyte de l'ordre de la nanomole en une dizaine de minutes. Cette méthode est simple (une seule étape), rapide mais sensible aux interférants présents dans l'échantillon. De plus, un important travail de formulation est nécessaire pour conserver la stabilité colloïdale. Le bruit, inhérent au test homogène, peut être significativement diminué en ajoutant des phases de lavages entre les divers étapes de reconnaissances spécifiques. Les phases hétérogènes offrent cette possibilité.

Phase hétérogène

Ce format a l'avantage d'éliminer les interférants grâce aux étapes de lavage et de travailler en excès d'anticorps, accélérant la cinétique et déplaçant ainsi l'équilibre vers la formation de complexe spécifique (contrainte thermodynamique liée à la valeur de l'affinité du couple antigène-anticorps) sans générer de bruit.

Le test le plus utilisé est le dosage d'immunoadsorption par enzyme liée ou ELISA (acronyme de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Le principe de ce test repose sur l'immobilisation de l'anticorps ou de l'antigène suivant la nature de la protéine à détecter. Le test ELISA non compétitif avec formation d'un sandwich direct est présenté dans ce paragraphe car il se rapproche du test d'agglutination magnétique mis au point au laboratoire de LCMD.

Première étape : immobilisation des anticorps

Une plaque en plastique (figure 2.3) comportant 96 puits (∅=6,5 mm ; H=2,5 mm ; 400 μL/puits) est fonctionnalisée en immobilisant des anticorps par simple interaction électrostatique (figure 2.4). Il s'agit très souvent d'anticorps monoclonaux, choisis pour leur sélectivité. Ils sont en excès par rapport à la quantité d'analyte à détecter.



Figure 2.3 – Photo d'une plaque en plastique utilisée pour les tests ELISA (13 cm × 9 cm).

Cette étape est assez critique car l'adsorption des anticorps sur le support n'est pas contrôlée. Ils peuvent s'adsorber en quantité variable rendant le test plus ou moins sensible ou même s'adsorber dans une orientation non satisfaisante, c'est-à-dire par la partie variable empêchant la fixation de l'antigène à détecter.

La fixation de l'anticorps suivant sa nature a été étudiée. Un véritable travail

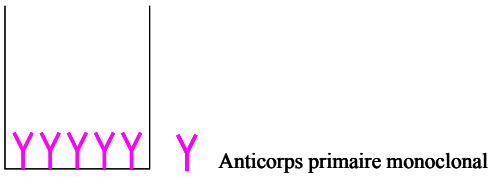


FIGURE 2.4 – Représentation schématique des anticorps immobilisés dans un puits.

d'ingénierie a permis de trouver les conditions optimales suivant l'anticorps. Certains résultats sont accessibles à travers les publications [10, 11, 12] mais la plupart relèvent du secret industriel [13].

D'autre part, la présence de cette surface solide génère des interactions non spécifiques avec l'antigène à doser ; fixation de l'antigène sur le support et non sur l'anticorps. Un choix judicieux de la nature des plaques permet de diminuer ces phénomènes en jouant sur les types d'interactions à la surface des puits. Par exemple, une surface en polystyrène est le siège d'interactions hydrophobes et si elle est irradiée, des interactions hydrophiles et covalentes viennent s'ajouter [14]. L'ajout d'agents tels que des solutions de protéines et/ou de surfactants après immobilisation des anticorps diminue également ces interactions non-spécifiques.
Deuxième étape : application de l'échantillon

L'antigène contenu dans l'échantillon va se lier spécifiquement aux anticorps (figure 2.5). Cette étape est limitée par sa diffusion dans le puits c'est-à-dire par le temps qu'il met pour être au contact des anticorps. Considérons un antigène de 5 nm de diamètre correspondant à un poids moléculaire compris entre 50 000 et 100 000 $g.mol^{-1}$, son coefficient de diffusion (D) est alors de 40 $\mu m^2.s^{-1}$. Son déplacement quadratique moyen (Δ) vaut [15] :

$$\Delta^2(\tau) = 6D\tau \tag{2.1}$$

avec τ représentant le temps de diffusion (en s)

Ainsi, une dizaine d'heures est nécessaire à l'antigène pour diffuser dans un puits de 2,5 mm de hauteur. Le volume du puits, le rapport volume du puits/surface fonctionnalisée et la concentration en analyte fixent le temps de diffusion. Ce temps

de diffusion est assimilé au temps de réaction car on suppose que la réaction antigène/anticorps est uniquement limité par l'étape de diffusion. Plus la concentration en antigène à détecter est faible, plus le temps d'incubation augmente. Ce temps varie entre 1 heure et 1 jour.

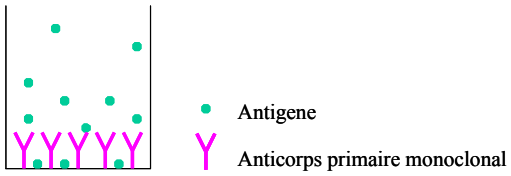


Figure 2.5 – Représentation schématique de l'ajout de l'antigène dans un puits.

Troisième étape : rinçage de la plaque

Le surnageant contenant d'éventuels antigènes libres et des interférants est éliminé. Une solution de lavage est ensuite ajoutée pour continuer la purification des puits. Les possibles interactions non spécifiques peuvent être rompues au cours de ces étapes. Le bruit de fond est ainsi diminué (figure 2.6).

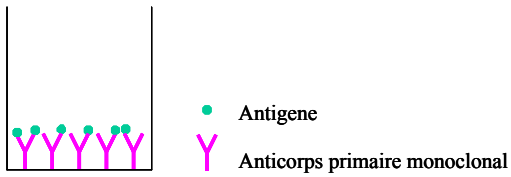


Figure 2.6 – Représentation schématique d'un puits après la première étape de lavage

Quatrième étape : révélation du complexe immun formé

Cette révélation se fait à l'aide d'un anticorps secondaire, généralement polyclonal, conjugué à une enzyme. Cet anticorps possède un paratope complémentaire à un épitope de l'antigène (figure 2.7). Il est ajouté en large excès afin de déplacer l'équilibre et d'accélérer la vitesse de réaction.

Cinquième étape : rinçage de la plaque et ajout du substrat

Tous ou presque tous les anticorps secondaires libres sont éliminés avant l'ajout de substrat (figure 2.8). Cependant un risque d'interaction non spécifique entre le support et/ou l'anticorps primaire et/ou l'antigène et l'anticorps secondaire existe,

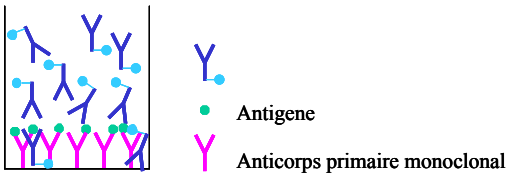


FIGURE 2.7 – Représentation schématique de l'ajout de l'anticorps secondaire dans le puits

engendrant un signal supérieur à la quantité d'analyte fixée (faux positif). Au mieux, si ce bruit de fond est reproductible, il diminue la sensibilité du test.

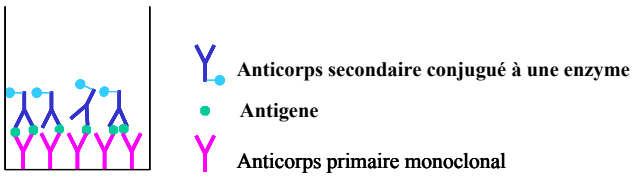


FIGURE 2.8 – Représentation schématique d'un puits après la deuxième étape de lavage

Sixième étape : activation de l'enzyme

Les enzymes conjuguées aux anticorps clivent le substrat en signal chromogénique stable (figure 2.9). Il s'agit très souvent de l'alkaline phosphatase ou de la peroxydase du radis noir (HorseRadish Peroxydase HRP). Tant que le substrat n'est pas entièrement consommé, le signal est amplifié. Ainsi le seuil de détection est fonction du temps d'incubation.

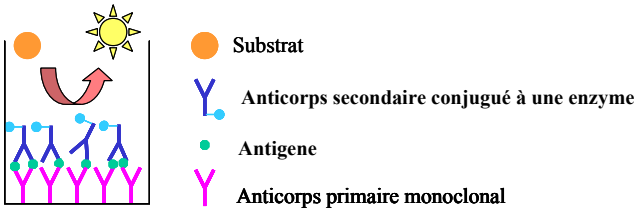


FIGURE 2.9 – Représentation schématique de l'ajout du substrat dans un puits

Pour chaque test, des solutions de calibration, de témoins positifs et négatifs sont mesurées. L'impact de la variabilité des volumes dispensés et de l'activité des réactifs sont réduits.

Les tests ELISA sur plaque détectent la picomole mais sont complexes et lents. Ces deux inconvénients sont minimisés par son automatisation diminuant ainsi la durée du test en effectuant plusieurs analyses en parallèle. En revanche, tout comme le test en format homogène précédemment cité, il ne permet pas de doser des antigènes de petite taille.

Test compétitif

Les tests en dosage "direct" nécessite la présence de deux sites de fixation sur l'antigène. Une étude récente a montré qu'une molécule possédant deux épitopes de 300 $Angström s^2$ séparés par 5 Angströms représentait la taille minimale pour la formation d'un sandwich [16]. En dessous de cette taille (cas rencontré pour certaines hormones et médicaments), la méthode par compétition est appliquée.

L'antigène à doser doit "prendre la place" d'un autre antigène marqué, de concentration connue, au niveau de l'anticorps. Ce phénomène a pour conséquence de faire baisser le signal. Historiquement, le premier test a été développé par Rubenstein pour détecter l'insuline en 1972 [17]. Le principe repose sur la présence d'un complexe immun entre un anticorps spécifique à l'insuline et une insuline préalablement liée à une enzyme. Dans cette configuration, l'enzyme est inactivée. Après l'ajout de l'insuline, l'équilibre est déplacé. L'insuline non marquée (insuline à doser) va prendre la place au niveau de l'anticorps de l'insuline marquée. En présence de son substrat, l'enzyme liée à l'insuline libre en solution est active.

Le principal inconvénient de cette méthode est sa sensibilité qui est fixée par l'affinité du couple antigène-anticorps à détecter. Pour une affinité de $10^{12}M^{-1}$ et une erreur expérimentale de 1%, la limite théorique de sensibilité ne peut être inférieure à $10^{-14}M$.

2.1.4 Etat de l'art

Actuellement, la référence en terme de sensibilité, de rapidité et d'automatisation est le test ELISA sur billes magnétiques [18]. Ces billes ont un diamètre de 1 μm ou 3 μm et proviennent de Dynal-Invitrogen. Les anticorps ne sont plus

immobilisés sur la surface des puits mais de particules magnétiques qui vont capturer l'antigène en solution. La suite est identique à celle des tests ELISA mais simplifiée en une seule étape. La révélation de l'antigène capturé par la bille se fait à l'aide d'un anticorps marqué par une enzyme, la HRP (figure 2.10). Cette enzyme va cliver le substrat pour donner naissance non pas cette fois-ci à un produit stable (test colorimétrique) mais à un intermédiaire réactionnel. Le retour à un état plus stable de cet intermédiaire émet une forte lumière. Cette méthode de détection rapide (signal visible et maximal après 5 minutes) est utilisée par les entreprises Beckman Coulter (Access Thyroid) et Biomérieux (Vidas) et est couplée à l'électrochimie par Roche Diagnostic (Cobas). Ainsi, une dizaine de femtomoles d'hormones stimulatrices thyroïdiennes (TSH) est détectée en 45 minutes.

Ce test a su tirer profit de la maturité des divers tests déjà existant au niveau des billes magnétiques et de la chimiluminescence. Les colloïdes accélèrent la vitesse de reconnaissance par leur mouvement brownien et en augmentant le ratio surface fonctionnalisée/volume des puits par rapport à la phase solide. De plus, grâce au caractère superparamagnétique des billes, leur déplacement est contrôlé par l'application d'un champ magnétique extérieur facilitant ainsi les étapes de lavage.

L'utilisation d'anticorps et la présence d'une surface solide nécessitent un réel savoir-faire au niveau de la physico-chimie afin d'optimiser au maximum les performances des tests immunologiques.

2.1.5 Les principaux problèmes engendrés par l'utilisation d'anticorps

Le greffage des anticorps

Tous les tests immunologiques immobilisent les anticorps sur une surface solide. Ces phases solides peuvent être classées en trois groupes. La première catégorie regroupe toutes les phases en matière plastique. Le test ELISA appartient à cette catégorie. Le deuxième groupe correspond aux microparticules. Ces particules ont l'avantage d'avoir une plus grande surface spécifique que les plaques et augmente la cinétique de réaction grâce à leur mouvement brownien. La dernière catégorie

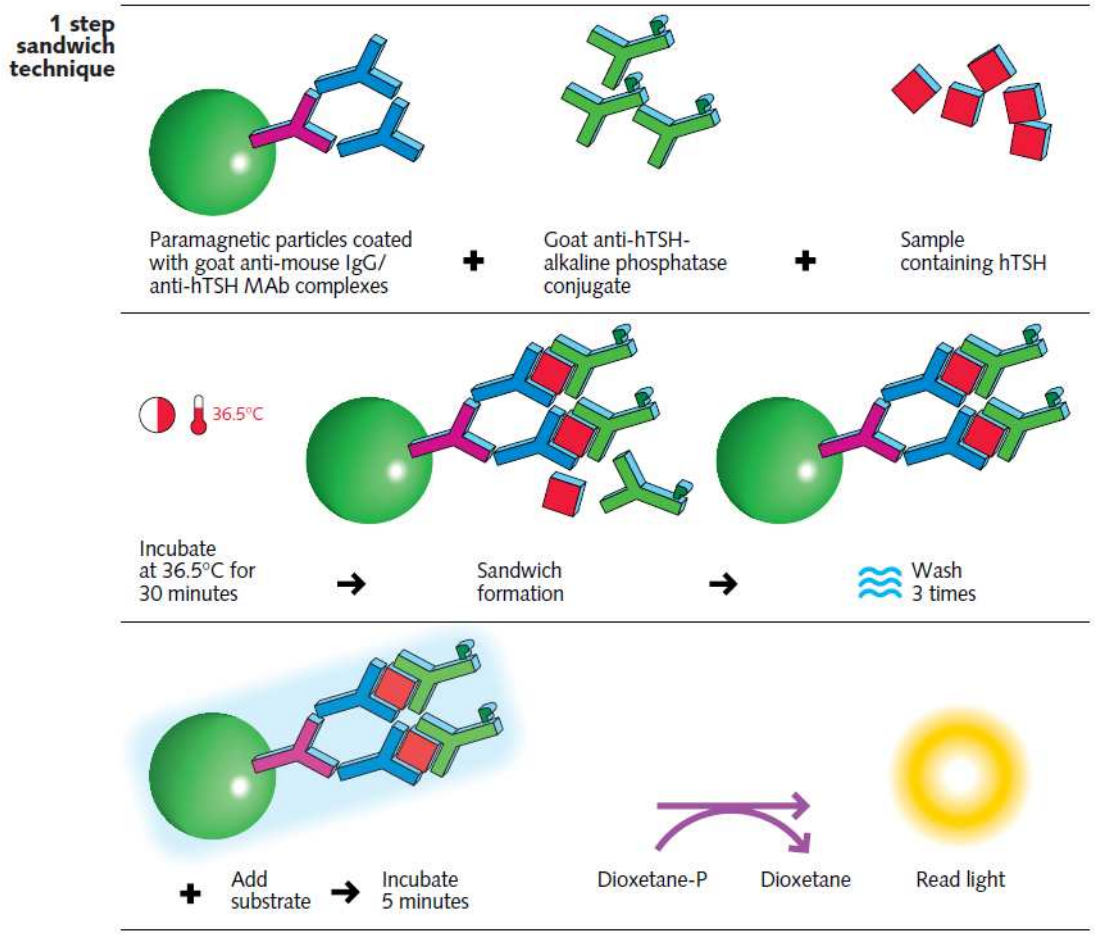


Figure 2.10 – Principe du test ELISA sur billes magnétiques développé par Beckman Coulter pour détecter la TSH avec une sensibilité de 0,01 $\mu IU/mL$. Des microparticules magnétiques sont greffées avec des anticorps de chèvre anti-IgG de mouton ayant réagi avec des anticorps monoclonaux de mouton anti-hTSH. Ces billes sont ensuite mélangées avec l'échantillon contenant la hTSH et des anticorps secondaires de chèvre marqués avec de l'alkaline phosphatase. Après 30 minutes d'incubation à 36,5°C, le sandwich bille-hTSH-anticorps secondaire est formé. Le milieu est lavé 3 fois. Le substrat est ajouté et le signal est visible après 5 min (Beckman Coulter).

rassemble toutes les membranes. Leur pouvoir d'absorption est 100 à 1000 fois supérieur à celui du plastique en raison de leur grande surface interne et elles permettent de travailler en présence de flux, accélérant ainsi la diffusion des espèces.

Elles peuvent être en ester de nitrate de cellulose (nitrocellulose), en nylon ou en polyvinylidène difluoride (PVDF).

Le greffage des anticorps se fait, soit par adsorption physique (mécanisme peu contrôlé), soit par couplage covalent. La fonctionnalisation de la surface est une étape très critique car elle peut déboucher sur une diminution de l'affinité des anticorps due à :

- une altération des paratopes si l'attachement de l'anticorps a lieu près d'un paratope
- une dénaturation de l'anticorps
- un problème de gêne stérique si le nombre d'anticorps par unité de surface est trop important

Au laboratoire, un greffage de type covalent est choisi pour fonctionnaliser les particules magnétiques car il permet de contrôler l'orientation des protéines, d'éviter leur dénaturation et est stable dans le temps, contrairement au greffage par adsorption. Les paramètres jouant sur le greffage covalent sont principalement les concentrations relatives en anticorps, le temps et la température de réaction. Les conditions physico-chimiques sont aussi à considérer car on travaille avec des objets colloïdaux [19]. Les particules magnétiques sont polymérisées ainsi des fonctions carboxyles, époxy ou amines peuvent être présentes à la surface de cette couche de polymère. Ces fonctions sont utilisées pour former des liaisons peptidiques avec les protéines. Ces protéines sont, soit des anticorps spécifiques à l'analyte, soit des protéines A reconnaissant la partie constante des anticorps d'une ou plusieurs espèces, soit des protéines génétiquement modifiées [20] pour purifier des solutions d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.

L'adsorption non spécifique

La présence d'une surface solide au sein de la réaction entre des ligands et leurs récepteurs nécessite d'inhiber ou de "bloquer" les interactions non spécifiques entre le ligand soluble et la phase solide où est immobilisé le récepteur. Les agents les plus utilisés sont les solutions de protéines et les surfactants non ioniques. Le choix de ces agents est guidé par la nature de la phase solide, du lien ligand-récepteur

et des résultats empiriques.

Les solutions de protéines, typiquement l'albumine sérique bovine (BSA), la caséine, le sérum foetal de bovin sont souvent utilisées après immobilisation des anticorps pour combler les espaces de la surface non occupés par les anticorps. La nature de la surface conditionne le choix de la solution de protéines. Par exemple, la caséine s'avère très efficace sur les surfaces en polystyrène et en nitrocellulose en raison de son faible poids moléculaire qui lui permettrait de combler de petits espaces.

Les surfactants non ioniques sont généralement utilisés pour prévenir les adsorptions hydrophobes de protéines sur la surface solide et diminuer l'agrégation hydrophobe de macromolécules c'est-à-dire diminuer les interactions non spécifiques entre protéines. Leur mécanisme d'action est similaire à celui des protéines. Leur petite taille et leur nature amphiphile leur permettraient de solubiliser la protéine. Le surfactant s'intercalerait entre la protéine via sa partie hydrophobe et la couche de solvant avec sa partie hydrophile. Les surfactants les plus utilisés pour les tests immunologiques sont le Tween, le Triton et le Nonident-40. On note également une possible inhibition de la reconnaissance spécifique par les surfactants ioniques qui dénaturent les protéines. Cet effet a été observé avec du sodium dodecyl sulfate (SDS).

En résumé, les agents de "blocage" des surfaces sont principalement des solutions de protéines et/ou de surfactants. Leur comportement dépend de la nature de l'interaction ligand-récepteur et de la surface solide. Ils peuvent également interférer avec des interactions spécifiques ou non.

Nous n'avons pas utilisé d'agent de blocage c'est à dire un agent permettant de saturer la surface des billes mais un tensioactif afin de stabiliser les billes magnétiques après application du champ magnétique. Il s'agit du tensioactif non ionique, le polyoxyethylène de masse moléculaire environ 12 600 g.mol^{-1}, commercialisé sous le nom de pluronic F-127 par Sigma Aldrich.

L'utilisation de colloïdes nécessite également de prendre en considération certains paramètres physico-chimiques tels que la force ionique, le pH et la température pour les stabiliser et ainsi éviter toute agrégation due à une mauvaise

formulation du milieu.

2.2 Le diagnostic au LCMD

2.2.1 Présentation

Au laboratoire, un test immunologique en phase homogène basé sur l'utilisation de billes magnétiques de 200 nm de diamètre, fonctionnalisées avec des anticorps a été développé. Ce test s'appuie sur la méthode classique d'agglutination (avec des billes de latex) en raison de sa simplicité. L'innovation réside dans l'utilisation de billes superparamagnétiques qui permet d'accélérer le temps du test. Il détecte la picomole par une simple mesure de turbidimétrie en dix minutes. Deux entreprises, Horiba et Bertin Technologies, sont en train de développer ce test pour détecter des protéines dans des fluides biologiques ou bien dans des prélèvements de diverses natures (poudre, en présence de pollens ...). Il a même fait l'objet d'un travail d'intégration pour le rendre transportable. Le bon fonctionnement et la robustesse de ce test sont donc démontrés.

Avant de détailler son principe, rappelons les propriétés des particules superparamagnétiques qui sont au centre de la réussite du test.

Le superparamagnétisme

Les particules sont dites paramagnétiques car elles acquièrent une aimantation en présence d'un champ magnétique qui disparait à l'interruption de ce dernier. Leur aimantation, caractérisée par une susceptibilité χ proche de 1, est bien plus grande que dans les matériaux classiques ($\chi \simeq 10^{-3}$) et définit le terme super.

Ce caractère superparamagnétique provient directement de leur composition. Elles sont constituées de grains magnétiques d'oxyde de fer de maghémite γFe_2O_3 d'une dizaine de nanomètres encapsulés dans une matrice organique. En absence de champ magnétique, les particules n'interagissent pas entre elles et se comportent comme des objets colloïdaux. Chaque grain possède un moment magnétique orienté aléatoirement en absence de champ. En présence d'un champ magnétique, les mo-

ments magnétiques s'orientent dans la direction du champ appliqué et un moment magnétique dipolaire induit est créé au sein de chaque particule (figure 2.11).

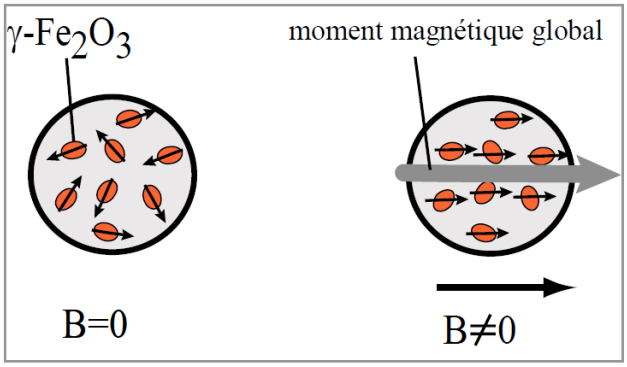


Figure 2.11 – Particules superparamagnétiques répondant à un champ magnétique. Avec l'application du champ magnétique B, il apparaît un moment magnétique induit au niveau de la particule (flèche grise).

L'interaction dipôle-dipôle entre chaque particule conduit à la formation d'une chaîne linéaire dans la direction du champ. L'interaction attractive dipolaire étant anisotrope : les particules s'attirent dans la direction du champ, et se repoussent perpendiculairement à ce dernier. Pour minimiser l'énergie magnétique totale, les particules s'organisent sous forme de chaînes. La formation des structures est réversible puisque, après interruption du champ, les attractions dipolaires disparaissent, les moments magnétiques des grains perdent leur orientation (figure 2.12). L'agitation thermique suffit alors à détruire l'ordre de la chaîne.

Première étape : capture de l'antigène

Des particules magnétiques de 200 nm de diamètre, recouvertes d'une centaine d'anticorps sont dispersées dans le milieu d'analyse (tampon ou sérum) en présence de l'antigène (figure 2.13) [21]. Cette étape est limitée par le temps de rencontre entre les antigènes et les billes ; temps fixé par leur diffusion.

Les antigènes soumis au mouvement brownien vont diffuser dans l'échantillon et réagir avec les billes en solution (figure 2.14). Ce temps de capture est fonction de la concentration en anticorps et de la quantité de billes, qui sont en large excès

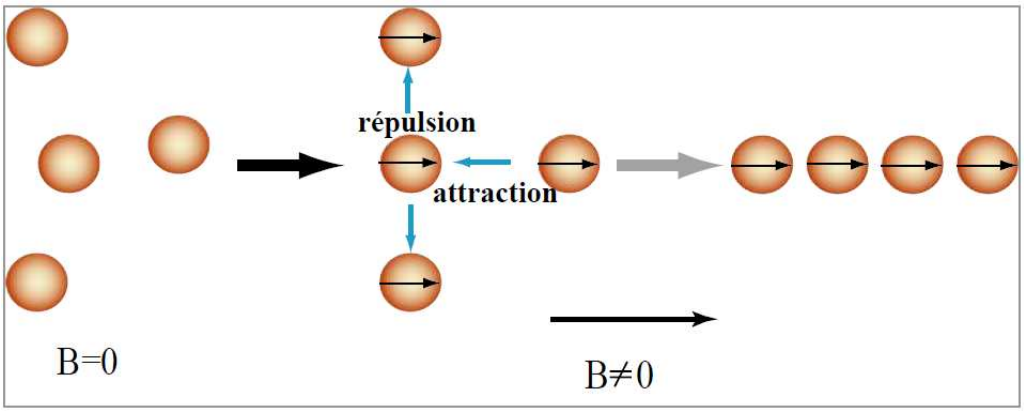


Figure 2.12 – Auto-organisation des particules superparamagnétiques sous champ.

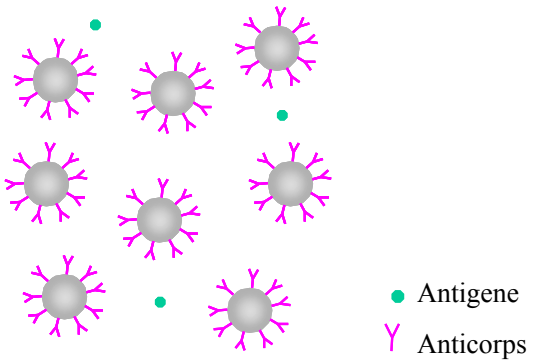


Figure 2.13 – Particules magnétiques recouvertes d'anticorps anti-antigène en présence d'antigènes

par rapport à la concentration en antigène. Après cette période d'incubation de l'ordre de la minute, tous les antigènes sont capturés par les billes et se trouvent à leur surface via les anticorps.

Deuxième étape : révélation de la capture primaire

Tout comme le test ELISA, la capture primaire est révélée par la formation d'un sandwich. Cette deuxième reconnaissance spécifique se produit une nouvelle fois entre une bille et l'antigène. Ce sont les anticorps présents sur la bille qui vont une nouvelle fois reconnaitre l'antigène. Mais cette fois-ci, l'antigène n'est

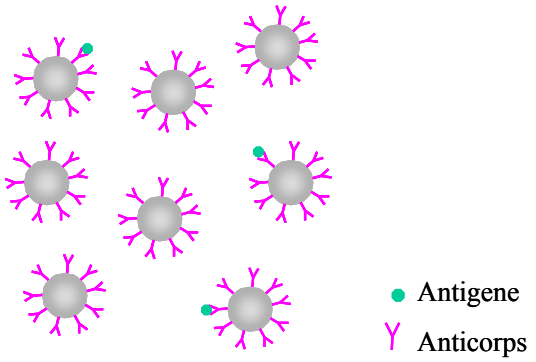


Figure 2.14 – Particules magnétiques ayant capturées l'antigène en solution via les anticorps à leur surface

plus libre en solution mais lié à la surface d'une bille. Le temps de formation de doublets, caractéristique de la présence d'antigène, dépend alors du temps de rencontre entre les billes. Cette étape est nettement plus lente que l'étape précédente car le coefficient de diffusion des objets varie en $\frac{1}{R^3}$. Cette dépendance explique les temps élevés des tests d'agglutination avec les billes de latex.

Grâce au caractère superparamagnétique des billes et à l'application d'un champ magnétique, ce temps de rencontre entre billes va pouvoir être grandement accéléré. Elles vont s'aimanter instantanément suivant les lignes de champ magnétique et se rapprocher suffisamment pour interagir spécifiquement avec l'antigène (figure 2.15).

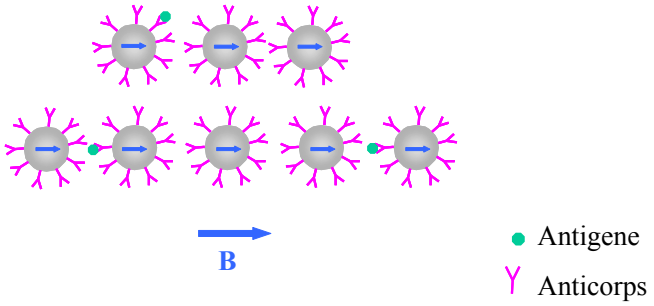


Figure 2.15 – Alignement instantané des billes magnétiques selon les lignes de champ magnétique. Les billes ayant capturées un antigène vont réagir avec leurs voisines pour former un doublet.

Troisième étape : détection turbidimétrique

Lorsque la réaction est terminée, le champ magnétique est coupé. Les billes qui ont été au contact avec l'antigène restent agrégées sous forme de doublets et les autres se redispersent instantanément en solution (figure 2.16). La présence d'antigènes en solution se manifeste par la formation de doublets car le nombre de billes en solution est supérieur au nombre d'antigènes. Ainsi, le nombre de doublets est proportionnel au nombre d'antigènes en solution.

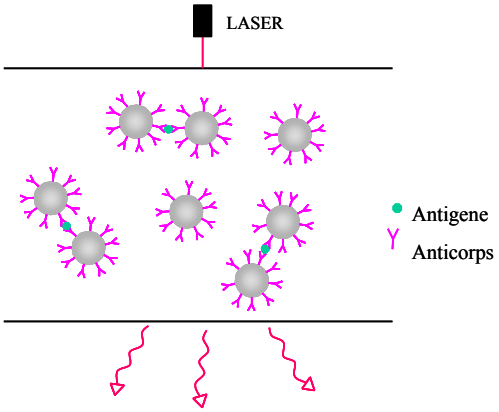


Figure 2.16 – Après arrêt du champ magnétique, seuls restent en solution les doublets formés spécifiquement. Une lecture turbidimétrique permet de doser le nombre de doublets en solution

La quantification de ces agrégats se fait par une simple mesure d'absorbance de l'échantillon où la densité optique (DO) de la solution s'écrit :

$$DO = -log(\frac{I_T}{I_0}) \tag{2.2}$$

avec I_0, l'intensité incidente et I_T, l'intensité transmise.

L'intensité transmise dépend de la taille et du nombre d'objets en solution. La mesure consiste alors à suivre la densité optique (DO) de la suspension qui augmente avec l'état d'agrégation des particules. Pour les tests d'agglutination sous champ, l'expérience consiste à mesurer la différence de DO avant et après application du champ magnétique.

Pour des objets petits devant la longueur d'onde de travail (approximation de Rayleigh), l'intensité diffusée est proportionnelle au carré du volume des objets. Ainsi, un doublet diffuse quatre fois plus qu'un singulet et deux fois plus que deux billes séparées permettant ainsi sa détection et sa quantification.

2.2.2 Rôle de la diffusion

En solution, la réaction entre les deux entités réactives antigène (Ag) et anticorps (Ac) conduit à un complexe C, selon l'équation :

$$Ag + Ac \rightleftharpoons C \tag{2.3}$$

Cette réaction élémentaire a pour loi de vitesse

$$v = k_{on}[Ag][Ac] - k_{off}C \tag{2.4}$$

où k_{on} et k_{off} sont les constantes cinétiques d'association et de dissociation.

La plupart des couples antigène-anticorps ont des constantes cinétiques d'association (k_{on}) très proches autour de $10^6 M^{-1}.s^{-1}$, cela revient à dire que le temps de formation d'un complexe est indépendant de la nature du couple considéré. Cette constatation permet de faire l'hypothèse que la réaction antigène-anticorps est limitée par l'étape de transport physique ou diffusion et non de transformation chimique ou réaction. En effet, la valeur de k_{on} est reliée au caractère brownien des protéines et au fait qu'une petite zone seulement est réactive [22]. En d'autres termes, un anticorps et un antigène réagissent à condition d'être suffisamment proches et bien orientés (patch réactionnel en vis à vis). Il n'y a pas de barrière énergétique.

Lors de notre test d'agglutination les anticorps sont greffés aux billes, ces problématiques de diffusion sont toujours présents et interviennent au cours de deux étapes : la capture de l'antigène en solution (1^{ere} étape) et la formation de doublets (2^{eme} étape).

Première étape

Cette étape a lieu entre les billes greffées d'anticorps et les antigènes et non comme vu précédemment entre les anticorps et les antigènes pour former un complexe C. Elle s'écrit [23] :

$$Antigene + Bille \leftrightharpoons C \tag{2.5}$$

La vitesse d'association s'écrit :

$$v = d_+[Antigene].[Bille] \tag{2.6}$$

où d_+ est constante cinétique d'association de Smoluchowski.

Cette constante prend en compte la diffusion translationnelle ainsi que la taille du patch réactif des objets, elle vaut [22]

$$d_+ = 4\pi DRf \tag{2.7}$$

où D = D_{Bille} + $D_{Antigene}$ est la somme des coefficients de diffusion de translation des billes et de l'antigène, exprimés en $m^2.s^{-1}$, R est la somme de leurs rayons et f le facteur de forme tenant compte de la taille du patch réactif et du coefficient brownien de rotation (D_{rot}). Dans le cas étudié, f vaut 0,2. Pour une bille de 200 nm de diamètre $D_{Bille} = 2.10^{-12}$ et un antigène de 10 nm de diamètre $D_{Antigene} = 2.10^{-12}$, $d_+ = 8,5.10^9 M^{-1}.s^{-1}$.

Le fait de travailler avec des billes considérées comme uniformément réactives accélère la vitesse de réaction, la constante d'association est amplifiée d'un facteur 100 par rapport à une réaction entre deux protéines en solution.

De plus, dans notre cas, nous travaillons en large excès de billes, la vitesse de réaction est alors considérée d'ordre 1. La concentration en billes est fixe et vient s'ajouter à la constante cinétique d'association de Smoluchowski.

$$v = d_+[Antigene] \tag{2.8}$$

où $k_{on} = d_+$.[Bille]

Le temps de réaction (τ) s'écrit :

$$\tau = \frac{1}{d_+[Bille]} \tag{2.9}$$

Pour une concentration en billes de 100 pM, le temps de réaction est d'environ 2 s. Cette première étape est donc très rapide et aucunement limitante.

Pour les tests habituels d'agglutination, la deuxième étape qui consiste à former des doublets est limitante cinétiquement car la constante cinétique d'association de Smoluchowski (d_+) dépend cette fois-ci uniquement des billes. La rencontre entre deux billes est plus lente car elle dépend du coefficient de diffusion translationnelle qui varie en 1/R ainsi que la bonne orientation des patchs réactifs qui est déterminée par le coefficient de diffusion rotationnelle des billes proportionnel à $1/R^3$.

Dans notre cas, le temps de rencontre entre les billes n'est plus limitant grâce à l'application du champ magnétique. Elles sont instantanément concentrées et se retrouvent à une distance suffisante pour former un lien. La phase d'association spécifique sous champ est gouvernée par l'orientation des patchs réactifs c'est à dire l'orientation des billes sous champ encouragée par un coefficient brownien de rotation élevé.

Deuxième étape

L. Cohen-Tannoudji a étudié la cinétique d'adhésion sous champ entre une bille portant un ligand et une bille saturée de récepteurs par une simple mesure d'absorbance.

La distance inter particule a été variée en jouant sur l'intensité du champ magnétique appliquée. Ce paramètre n'a aucune influence sur la cinétique de réaction dès lors que des chaînes sont formées. D'autre part, on remarque que le temps de réaction est plus grand que le temps caractéristique du mouvement de diffusion de rotation τ_{rot}. En d'autres termes, le temps de formation de doublets est plus grand que le temps de rotation d'une bille.

L. Cohen-Tannoudji a montré que ce temps dépendait de l'aire explorée par le ligand grâce à une expérience basée sur le système modèle streptavidine/biotine [24]. Une bille recouverte de biotines (récepteurs) est mise en regard avec une autre "bille biotine" qui possède une streptavidine à sa surface figure 2.17.

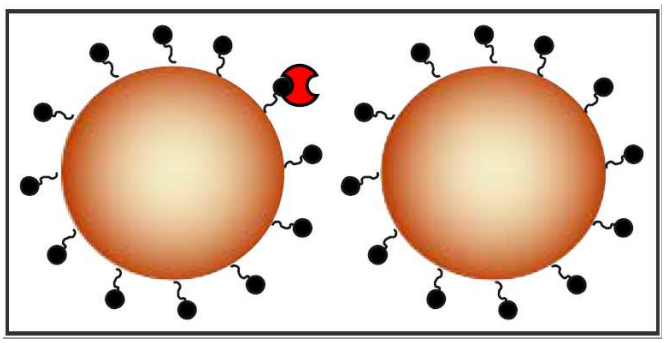


Figure 2.17 – Représentation du système utilisé par L. Cohen-Tannoudji pour étudier l'influence de la mobilité des récepteurs à la surface des billes. Les billes sont recouvertes de biotines et une bille porte une streptavidine (en rouge ligand).

La mobilité de la biotine a été augmentée par l'ajout de polymères : LC-LC et PEG-3400 entre la surface de la bille et la biotine. Les rayons de giration sont respectivement de 1 nm et 2,5 nm. Les courbes cinétiques ainsi obtenues sont présentées figure 2.18.

Plus le rayon de giration est grand, plus la formation de doublets est rapide. Autrement dit, plus le ligand et le récepteur sont mobiles à la surface des billes, plus la reconnaissance est rapide. Le temps de reconnaissance avec un rayon de giration de 2,5 nm est 200 fois plus rapide qu'avec une configuration rigide. La reconnaissance sous champ est encore une fois un problème de diffusion c'est-à-dire de rencontre. Elle dépend de la taille de la cible, du coefficient brownien de rotation des billes (dépendance en $1/R^3$) et de la mobilité des récepteurs à la surface des colloïdes.

Le test d'agglutination magnétique ainsi développé permet d'accélérer la première reconnaissance antigène-anticorps par l'utilisation de colloïdes et la rencontre entre colloïdes pour révéler cette première capture. Cette reconnaissance sous champ magnétique est l'étape limitante. Elle se résume à un problème de

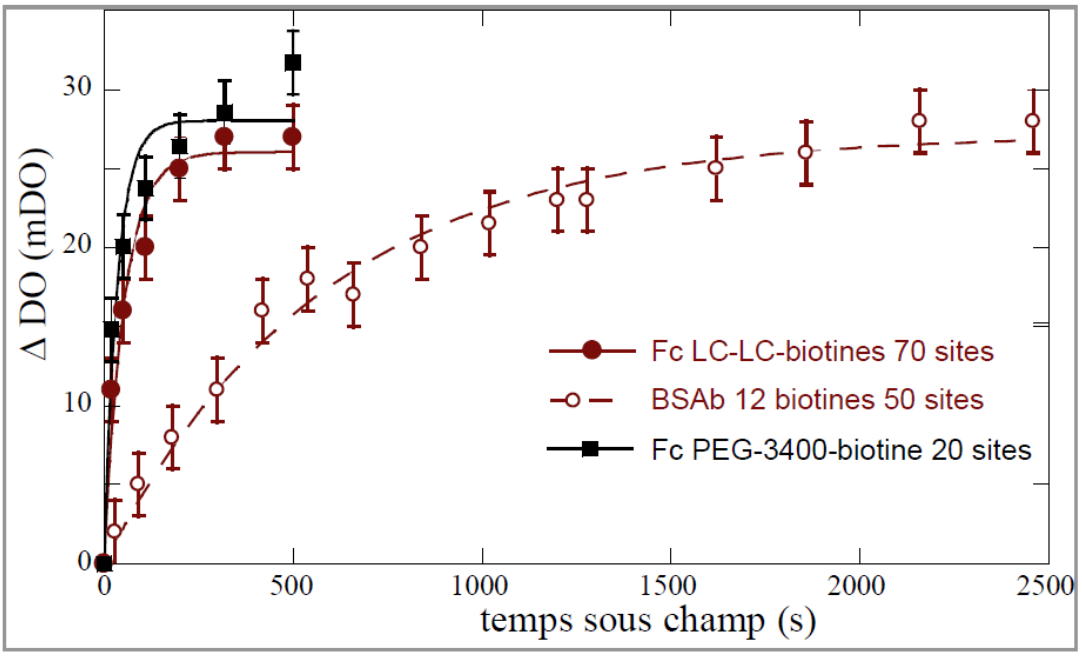


Figure 2.18 – Cinétique de formation de doublets sous un champ de 30 mT, pour différentes configurations symétriques. Avec liaison à la surface par un PEG-3400 (15 nm) ■, par un "LC-LC" (3 nm) • et par contact direct ∘.

diffusion régit par la taille des objets et l'aire balayée par les entités à la surface des colloïdes.

2.2.3 Dosage

Protocole

Le système modèle streptavidine/biotine est utilisé du fait de sa remarquable affinité et stabilité et des billes carboxyliques de 213 nm de diamètre vendues par Ademtech.

Ces particules sont fonctionnalisées pour détecter la biotine. Dans ce but, des streptavidines sont greffées à la surface des billes. La biotine étant une petite molécule "monovalente", on utilise comme ligand de la BSA (Albumine de sérum bovin) biotinylée plusieurs fois. Le nombre de biotines par molécule de BSA est estimé à 12 biotines par BSA d'après les données du fournisseur Sigma-Aldrich.

Les solutions de biotines et de billes sont préparées dans du tampon phosphate à 250 mM, pH=8,5 avec 1 % de F-127. La quantité de billes renseignée se trouve sous forme d'un pourcentage massique. Connaissant la masse volumique d'une bille (donnée fournie par le fabricant), nous pouvons en déduire la concentration en billes afin de raisonner avec les mêmes unités pour l'antigène et les billes.

$$[Bille] = \frac{\%_{massique}}{100.V_{Bille}.0,001.\rho.N_A}$$

avec $V_{Bille} = 4.10^{-15} cm^3$, $\rho = 2 g.cm^{-3}$ et $N_A = 6,022.10^{23} part.mol^{-1}$

A cette étape, la concentration en particules est de 140 pM. A 300 μL de suspension, on ajoute 300 μL d'une solution de BSA biotinylée (BSAb) de concentration connue. Les concentrations « effectives » en ligands sont sans doute plus faibles que celles estimées, d'autant plus que la BSA a tendance à s'adsorber aux interfaces, et donc aux parois des divers récipients utilisés au cours des différentes manipulations. Cette étape d'incubation est réalisée à 25°C et dure une dizaine de minutes. Elle est réalisée en mélangeant des solutions de concentrations faibles et proches pour assurer une répartition homogène des ligands, c'est-à-dire pour éviter que des particules captent plus d'une BSAb. Après l'étape d'incubation, la densité optique initiale (DO_i) des suspensions est mesurée à 632 nm, en utilisant un spectrophotomètre (HORIBA). Puis, les échantillons sont placés dans un champ magnétique de 30 mT pendant un temps 10 min. A l'issue de l'étape de champ magnétique, la densité optique des suspensions est mesurée (DO_t).

Résultat

On considère que la différence de DO est directement proportionnelle au nombre de doublets formés (ce calcul sera détaillé dans le chapitre suivant). Ainsi, la variation de DO (ΔDO) traduit un nombre de doublets vu les faibles concentrations de BSAb employées. La correspondance entre la concentration de BSAb dans le milieu d'analyse et la concentration de doublets formés est alors possible (figure 2.19).

Le nombre de doublets formés correspond à 50 % du nombre de ligands in-

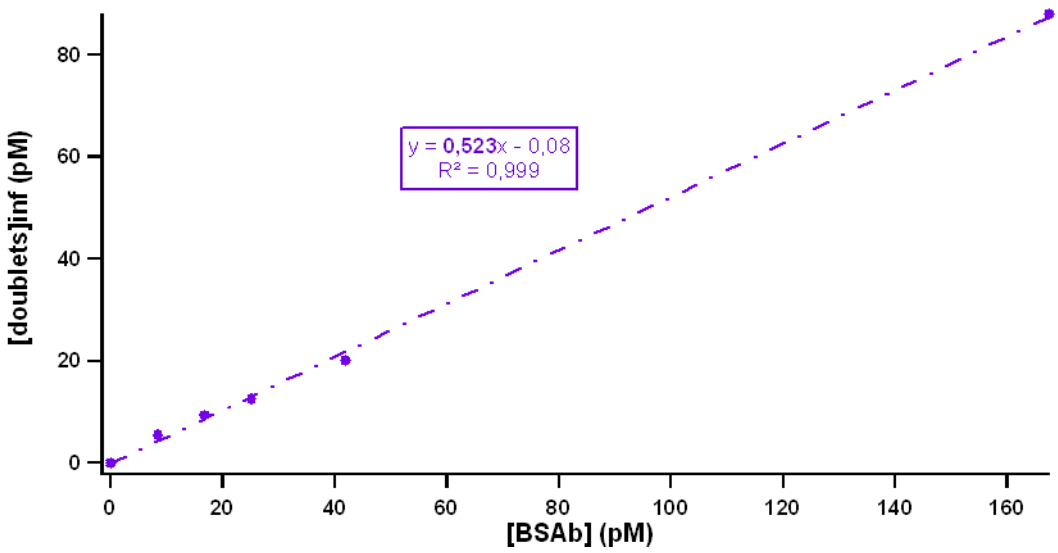


FIGURE 2.19 – Evolution de la concentration de doublets à la saturation (extrapolation des données brutes) en fonction de la concentration en BSAb après application d'un champ magnétique de 30 mT pendant 10 min en milieu tamponné (tampon phosphate 250 mM, pH=8,5 avec 1 % de F-127). Les billes sont greffées avec une cinquantaine de streptavidines et la concentration de billes est de 70 pM. Expériences réalisées par M. de Geus

troduits. Nous trouvons donc moins de doublets qu'attendus, sachant que pour le couple streptavidine-biotine il n'y a pas de limitation thermodynamique (affinité : $K_A = 10^{14} - 10^{15} M^{-1}$). La principale source d'incertitude réside dans le calcul du nombre de doublets qui dépend de l'indice de réfraction des billes. Cette valeur n'est pas très bien connue et n'a pas été déterminée car elle induit au maximum un facteur 2 d'erreur.

2.2.4 Conclusion

Le test d'agglutination magnétique, développé au laboratoire, est quantitatif, sensible (la picomole) et rapide (10 min). Il a été adapté à divers systèmes, des systèmes modèles tels que l'ovalbumine [21] et le couple streptavidine-biotine en milieu tamponné, des systèmes réels adaptés au diagnostic avec les D-dimères et la ferritine en milieu tamponné et plasmatique et enfin des systèmes orientés sur

la détection d'agents de la menace bactériens et protéiques en présence de pollens, de fumées .... Ces agents ne peuvent être cités pour des raisons de confidentialité.

Ce test s'inscrit totalement dans le paysage actuel des tests de diagnostic comme nous allons le constater ci-dessous.

2.3 Les tests présents et futurs

Les tests de diagnostic peuvent se répertorier en deux catégories :

- 1ère catégorie : test robuste, simple, rapide, bon marché et peu sensible de l'ordre de la nanomole
- 2ème catégorie : test très sensible de la picomole à la femtomole voire à l'attomole, de mise en oeuvre plus complexe

Les axes de développement portent soit sur l'augmentation de la sensibilité des tests de la 1^{re} catégorie, soit sur la simplification de la 2^{me} catégorie, avec une préférence pour cette voie. En effet, le marché du diagnostic convergeant de plus en plus vers le marché du point of care c'est-à-dire vers les tests à domicile ou chez le médecin, la simplicité, la rapidité, la robustesse et la transportabilité sont donc les principales lignes directrices d'évolution en vue d'un test complètement intégré et peu cher. La possibilité de détecter plusieurs analytes en même temps (multiplexage) s'impose également. Les points d'amélioration/d'évolution portent principalement sur :

- la préparation de l'échantillon
- le déroulement du test (nombre d'étapes, intervention extérieure ou non)
- le mode de lecture de la réponse

Dans cette optique, les sytèmes microfluidiques se sont beaucoup développés ces dernières années car ils permettent la miniaturisation et l'intégration de fonctions complexes. Ainsi, ils supportent la complexité des protocoles présents en laboratoire tout en restant transportables et activés simplement. Ce format facilite le transport de l'analyte et diminue ainsi le temps d'analyse [3].

Dans ce paragraphe, nous présentons des tests immunologiques très sensibles commercialisés, en voie de commercialisation ou encore en développement. Cette

liste est non exhaustive et tente de faire un état de l'art du diagnostic actuel et futur.

2.3.1 Tests commercialisés

Tous les tests présentés ci-dessous se basent sur la formation d'un double complexe immun (sandwich) et une détection optique en raison de sa simplicité et de son faible coût.

Les tests immunochromatographiques

La technique d'immunochromatographie sur membrane a pour phase solide une membrane en nitrocellulose (figure 2.20). L'échantillon à tester est déposé à l'extrémité de cette membrane. Si l'antigène recherché est présent dans l'échantillon, il se lie avec des anticorps spécifiques marqués avec des nanoparticules d'or [25, 26] ou avec des liposomes contenant du sélénium [27] présent à l'endroit de dépôt de l'échantillon. Puis, un tampon de lyse-migration est ajouté, il permet la migration des complexes antigènes-anticorps par capillarité. Des anticorps de capture spécifiques à l'antigène, fixés sur la membrane, vont permettre d'arrêter ces complexes. Un résultat positif se traduit alors par l'apparition d'une ligne colorée. De plus, un contrôle interne permet de valider chaque test. Ce contrôle interne est permis par une zone témoin qui doit être colorée pour que le test soit valide. Sa coloration témoigne de la migration des anticorps spécifiques de l'antigène marqués mais non fixés à l'antigène, ces anticorps en excès sont capturés par des anticorps spécifiques fixés sur la membrane [28].

La réponse est visible une quinzaine de minutes après le dépôt de l'échantillon. La préparation de l'échantillon se fait directement sur la membrane. Ce test est rapide, simple, transportable et robuste. Depuis les années 90, ce test a permis de diagnostiquer la malaria dans des pays dépourvus d'infrastructures et de personnels qualifiés dans des conditions climatiques assez extrêmes (température supérieure à 30°C) [28]. Plusieurs entreprises de diagnostic telles que BD diagnostics Systems, All Diag, Binax, Bio-Rad... possèdent leur test sur membrane pour détecter

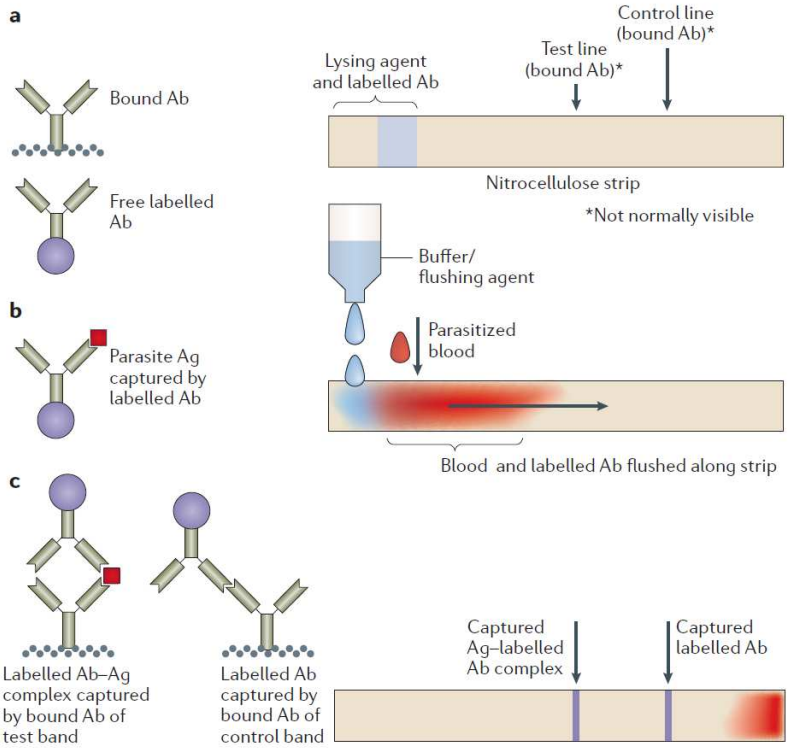


Figure 2.20 – Représentation schématique du mode d'action d'un test immunochromatographique.a) La membrane contient trois bandes : la première correspond à l'anticorps marqué avec du sélénium, spécifique à l'antigène cible, situé au début de la membrane de nitrocellulose. La deuxième bande est fonctionnalisée par un anticorps, spécifique à un autre épitope de l'antigène cible et la troisième bande est la bande de contrôle contenant l'anticorps spécifique aux anticorps marqués en excès. b) Dépôt de sang (5 à 20 μL) et de tampon au début de la bandelette. Les complexes formés vont migrer à travers la membrane. c) Si l'antigène est présent, les anticorps marqués sont capturés sur la bande test. Les autres anticorps marqués sont arrêtés au niveau de la bande de contrôle. Si la quantité d'anticorps immobilisés est importante une fine bande visible à l'oeil apparait. D'après [28].

des parasites (malaria avec le *plasmodium falciparum*), des virus (Epstein Barr, VIH...). Les tests sur membrane sont très sélectifs et sensibles pour la détection d'anticorps. Leur performance baisse un peu lorsqu'il s'agit de petites protéines (virus *Orthomyxovirus influenzae A ou B*) [29] . De plus, dans le cas des tests VIH, une confirmation doit être effectuée par western blot lorsque le test est positif du fait de la possibilité de faux positifs.

Récemment, la sensibilité de ces tests a été augmentée d'un facteur dix avec l'utilisation de liposomes renfermant de nombreux marqueurs fluorescents par rapport aux conventionnelles nanoparticules d'or [30].

Ces tests répondent aux attentes du marché du diagnostic des pays développés - le point of care - et des pays en voie de développement. De plus, la réponse autrefois binaire : oui/non et de plus en plus quantitative via des lecteurs optiques.

Les tests turbidimétriques

Le principe de cette méthode de détection est explicité lors de la présentation du test de diagnostic du laboratoire. L'entreprise Roche a développé un automate, le COBAS INTEGRA, pour détecter la nanomole de CRP en cinq minutes [31] et mélange deux tailles de billes pour agrandir la fenêtre de travail.

Pour des applications militaires sur le terrain, l'entreprise Bertin Technologies a développé un test portatif et robuste, appelé KIM, d'une dizaine de kilos (figure 2.21). La picomole est alors détectée en une dizaine de minutes.



Figure 2.21 – Photo du Kim dans des conditions d'utilisation réelles c'est-à-dire sur le terrain avec un manipulateur peu expérimenté (Photo de Bertin Technologies).

Test ELISA

Le test ELISA sur plaque est l'un des tests le plus répandu dans les centres d'analyses médicales. Il est automatisé mais reste encombrant. La société Bio-Rad a développé un test pour détecter l'antigène du virus de l'immunodéfiscience humaine (VIH) et des anticorps associés au virus VIH-1 et VIH-2 avec une détection limite de la picomole en deux heures (Genscreen Ultra HIV). Cette durée de test a été diminuée avec l'utilisation de colloïdes magnétiques (cf test TSH de Beckman Coulter paragraphe 2.1.4).

Ce test se présente comme l'ancêtre des tests actuels. Son efficacité est démontrée et son coût reste avantageux en raison du nombre important de tests effectués par jour. Ses concurrents s'appuient en général sur la même méthode à savoir la formation d'un sandwich mais utilise de nouvelles méthodes de détection.

Une variante du test ELISA : la détection par chimiluminescence

Ce test se présente comme le "golden standard" des tests de diagnostic. De nombreuses entreprises telles que Roche Diagnostic (Cobas), BioMérieux (Vidas) et Beckman Coulter (Access Thyroid) s'appuient sur cette technique pour détecter la dizaine de femtomoles de TSH en 45 minutes.

2.3.2 Tests en cours de commercialisation

La principale évolution des tests immunologiques concerne le mode de détection utilisé pour révéler la présence du complexe immun. L'enjeu consiste à associer un signal mesurable à chaque association antigène-anticorps. Certaines méthodes telles que la spectroscopie d'une molécule unique, offrent une sensibilité de la nanomole. Cette limite de détection est aujourd'hui jugée trop petite. L'amplification du signal est alors nécessaire. Une grande affinité des anticorps est le postulat d'une détection sensible.

Les méthodes de détection sont principalement tournées vers l'optique : me-

sure d'absorbance, de fluorescence, de lumière diffusée.... Toutes ces approches se heurtent très souvent au bruit de fond occasionné par les fluides biologiques, autofluorescence, absorbance. Il est à noter que seule la chimiluminescence qui produit de la lumière par réaction chimique s'affranchit de ces problèmes inhérents à l'échantillon. Ces derniers temps, des mesures magnétiques, mécaniques (microbalance à quartz), électriques (mesure de potentiel électrochimique, potentiométrique, ampérométrique...) se sont développées. Le signal, dans ces cas, provient uniquement d'association spécifique et non spécifique. Elles sont sensibles mais nécessitent un système de mesure assez complexe.

Concernant la détection optique, l'utilisation de molécules marquées est toujours répandu et actif même si dernièrement une nouvelle méthode de détection basée sur le changement de propriété optique d'une surface, ne nécessitant ainsi aucun travail de fonctionnalisation, est apparue. D'autres modes de détection, issus du monde informatique par exemple, se sont imposés. Les tests présentés ci-dessous sont classés selon leur méthode de détection : la détection optique présentant le plus grand nombre de développement en raison de son coût et de la familiarité des biologistes avec cette technique et la détection magnétique.

Détection optique

Les tests en phase homogène par transfert de fluorescence

Certaines équipes, telle que celle de M. T. Soukka, utilisent des tests d'agglutination à partir de billes fluorescentes. Dans ce cas, deux billes (donneur et accepteur) sont nécessaires pour émettre un signal grâce à un jeu astucieux de transfert de photons entre la bille donneuse et la bille acceptrice. En présence d'antigènes, ces billes vont former des paires spécifiques. Une fois la capture de l'antigène en solution et la formation des paires réactives terminées, la solution est ensuite illuminée dans l'UV-visible (figure 2.22). La bille donneuse va absorber cette énergie lumineuse pour la transférer à la bille acceptrice pour émettre un signal dans le proche infra-rouge. Grâce à cet écart entre les longueurs d'excitation et d'émission, le signal est peu bruité. Cette méthode est utilisée pour détecter l'antigène prostatique spécifique (PSA) à une concentration limite de quelques na-

nomoles en 90 min [32]. Ce test est automatisé sous le nom Kryptor par la société BRAHMS.

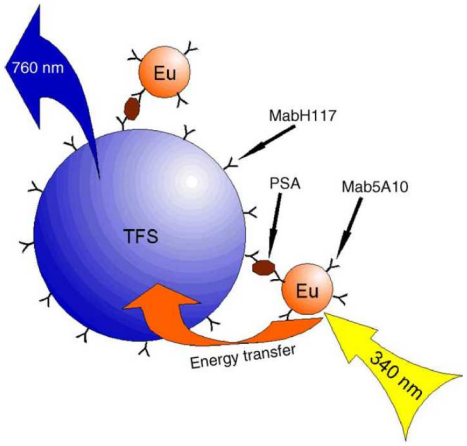


Figure 2.22 – Représentation du transfert d'énergie après réaction immunologique. La nanoparticule donneuse en europium (diamètre de 107 nm) est greffée avec des anticoprs 5A10-anti-PSA et la nanoparticule acceptrice en TFS (diamètre de $2\mu m$) est greffée avec des anticorps H117-anti-PSA. La taille des particules n'est pas proportionnelle [32].

Ce test est homogène, rapide et sensible mais nécessite des réactifs complexes et coûteux.

Les boites quantiques ou Quantum Dots

Les quantum dots (QD) sont des cristaux de semi-conducteurs de forme sphérique dont les dimensions ne dépassent pas quelques nanomètres. Ils sont capables d'émettre des photons de fluorescence. La longueur d'onde d'émission est fixée par la taille, la forme du nanocristal et la profondeur du potentiel (nature de matériaux). Aucun test de diagnostic en cours de commercialisation utilise ces QD mais leur maturité et de leur forte ressemblance avec les marqueurs fluorescents organiques laissent supposer une rapide application au diagnostic. Ces nanomatériaux possèdent de nombreuses caractéristiques les rendant très intéressants par rapport aux marqueurs de fluorescence "classique " tels que la fluorescéine, la rhodamine... :

- un coefficient d'absorption élevé
- un bon rendement de fluorescence (jusqu'à 80 % de la lumière absorbée est rendue sous forme de fluorescence)

- une bonne résistance au photo-blanchiment (éclairés, ils peuvent continuer à émettre une lumière fluorescente durant plusieurs minutes, voire pour certains plusieurs heures contrairement aux colorants organiques qui perdent leur capacité de fluorescence dans les quelques secondes)
- un multiplexage grâce à un large spectre d'émission pour une même absorption ; les plus petits émettent dans le bleu et les plus "gros" dans le rouge

Malgré ces propriétés optiques attrayantes (objets très lumineux), les QD n'ont été que très peu commercialisés comme marqueur fluorescent en raison de leur difficile solubilisation en milieu aqueux et de leur problème de stabilité. En effet, après synthèse, ils sont recouverts de ligands hydrophobes qui doivent être rendus hydrophiles pour les solubiliser tout en protégeant leur surface des charges présentes en solution qui détruiraient leur fluorescence. Ces conditions commencent à être satisfaites simultanément grâce au greffage de nouveaux ligands de surface ayant une partie hydrophile. Cette méthode permet de rendre les QD solubles dans l'eau mais de nombreux problèmes d'adsorption non spécifique et d'agrégation apparaissent lors d'une utilisation in vitro. L'enjeu de leur application au diagnostic se situe au niveau de la formulation du milieu d'analyse.

Une fois le problème de formulation réglé, les QD sont utilisés dans un format classique de test d'agglutination où ils remplacent les particules de latex. Ils sont greffés avec des anticorps spécifiques à l'antigène cible et détectés soit par une simple mesure de fluorescence [33], soit par cytométrie de flux [34]. La présence d'analyte provoque l'agrégation des QD. Ces agrégats sont dénombrés et classés en fonction de leur taille via l'intensité de lumière diffusée à 0° et à 90°. Cette technique permet également la détection simultanée de différentes protéines (multiplexage) en fonction de la fluorescence des QD. Une longueur d'émission correspond à une protéine cible. Cette méthode permet de détecter la picomole en une heure en présence de plusieurs protéines cibles et atteint 50 fM toujours en une heure pour un analyte unique. Le temps expérimental est ici principalement fixé par la taille minimale des objets détectables en cytométrie ; autour de 200 nm. Un QD ayant un diamètre compris entre 15 et 20 nm, les agrégats doivent contenir une dizaine de QD, ralentissant la cinétique de réaction.

Ce test s'appuie sur une méthode de détection mature dans le monde du diagnostic médical - la cytométrie de flux - offrant une lecture rapide, simple et individuelle. Suivant la concentration de QD utilisés, la gamme de mesure change. Pour une concentration de 10 pM en QD, la fenêtre de travail de ce test couvre quatre ordres de grandeurs de la femtomole à la centaine de picomole [35]. Si cette concentration est augmentée d'un facteur dix, elle s'étend du dixième à la cinquantaine de micromoles. Toutes les valeurs précédemment citées sont obtenues en milieu tamponné (PBS-BSA) dans des conditions en ions, pH similaires à celles d'échantillon physiologique tel que le plasma.

Ces QD sont également utilisés pour leur propriété électrique comme marqueurs dans les tests immunochromatographiques [36]

Depuis quelques années, de nombreuses entreprises produisent des QD destinés en grande partie au milieu de la recherche. Elles contribuent également aux avancées des travaux sur leur application au diagnostic mais actuellement aucun test est abouti à cause des problèmes de formulation soulevés par ces QD.

Détection par résonance plasmonique de surface (SPR)

De nombreuses méthodes de détection optique sont basées non pas sur la détection d'un signal optique, provenant directement de molécules marquées comme celles citées précédemment mais sur la modification des propriétés optiques de surface ou de guide d'onde, engendrée par la formation de complexes cible-sonde. L'exemple le plus représentatif de ces techniques repose sur l'utilisation du phénomène de résonance plasmonique de surface. Le principe de la détection consiste à suivre les variations de l'angle de réflexion des ondes plasmoniques pour lequel l'intensité de lumière réfléchie est minimale. Ainsi, en plaçant des ligands sur la surface métallique, il est possible d'utiliser les variations d'indice de réfraction provoquées par l'immobilisation de molécules sur la surface (i.e. les variations de l'angle de résonance) pour étudier la cinétique de l'interaction ligand-récepteur [37, 38].

Cette technique s'est grandement développée depuis les années 90, avec l'avènement d'appareils commerciaux tels que le Biacore, pour quantifier et qualifier les interactions réversibles entre les macromolécules biologiques. Elle permet de

screener rapidement l'affinité des anticorps pour un antigène cible. La sensibilité de la détection est inférieure à 1pg/mm^2 et ne nécessite aucune étape de marquage de molécules à analyser. De plus, les molécules demeurent en solution tout au long de l'expérience et conservent donc toute leur réactivité. Leur seule présence à la surface du dispositif permet de modifier l'indice de réfraction du milieu sur la surface et d'engendrer une variation de l'angle de résonance. Jusqu'ici son utilisation au diagnostic était limitée en raison du coût de revient d'un test par rapport à la sensibilité offerte.

Des dispositifs de SPR en microfluidique intégrant une étape de filtration de l'échantillon avant analyse existe mais reste peu sensible [26]. Depuis 2008, la société ICx technologies a miniaturisé cet appareil à travers la gamme SensiQ [39]. Le prix d'un test est potentiellement de 1 dollar. Actuellement, ces appareils équipent les laboratoires de recherche mais ne sont pas encore ou très peu appliqués au diagnostic.

Le non marquage des analytes et la lecture instantanée rendent cette méthode très attractive. Cependant, sa faible sensibilité au vu des méthodes actuelles la rend moins avantageuse. L'amplification du signal via des nanoparticules d'or est possible mais cela rajoute de la complexité et augmente le coût d'un test.

Les tests "papier"

L'équipe de G. M. Whitesides a mis au point une puce microfluidique capable de distribuer l'échantillon dans une multitude de trous (endroits réactionnels) en un temps très court sans aucune pompe. Cette puce joue sur les propriétés hydrophiles du papier pour véhiculer les fluides et celles hydrophobes de certains polymères pour piéger quelques nanolitres de solution au niveau de trous. Les fluides sont distribués verticalement et latéralement, sans risque de diffusion aux intersections. En quelques minutes, un millier de trous sont remplis. La détection et la quantification se font par colorimétrie. Ce système est flexible. La nature de la phase stationnaire de la puce peut changer suivant les composés cibles ; elle peut être en cellulose (papier), en verre, en polymère ou en métal.

Cette technologie est tout à fait adaptée au diagnostic mais également à d'autres applications telles que la culture cellulaire [40].

Actuellement, une start-up non lucrative "Diagnostic for all", issue du laboratoire de M. Whitesides, développe un test révélant l'état de santé du foie. Ce test vise à la fois les pays développés car cet organe est très endommagé lors des traitements "lourds" du VIH par exemple, et les pays en voie de développement qui ne possèdent pas ou très peu de tests dédiés au foie. Le prix d'un test est de 0,03 dollar [41].

Comme la plupart des tests sur "bandelette", ce test est très bon marché et facilement transportable (peu encombrant et bonne résistance aux chocs, aux variations de température...). Il offre, de plus, la possibilité de détecter de multiples agents simultanément. La réelle innovation de ce test réside dans la simplicité et la rapidité de véhiculer les fluides. Seul bémol, sa limite de détection jugée peu sensible. Une nouvelle méthode de détection telle que la fluorescence, la chimiluminescence... pourrait dépasser cette limitation.

Le code-barre biologique

L'originalité de cette méthode porte sur l'amplification du signal après reconnaissance de la cible via des brins d'ADN. Elle représente une belle avancée au niveau de la chimie car pour la première fois, la chimie des ADN et des protéines sont rendues compatibles.

Ce test s'appuie sur la formation d'un sandwich entre des particules magnétiques greffées d'anticorps monoclonaux, de l'analyte cible et des nanoparticules d'or recouvertes d'environ 180 brins d'ADN et de quelques anticorps polyclonaux [42]. Une fois les nanoparticules d'or liées au complexe particule magnétique/analyte, une solution de dithiothreitol (DTT) est ajoutée pour détacher les 180 brins d'ADN porté par les particules d'or. Ces codes-barres sont ensuite détectés sur une puce où sont immobilisés des brins d'ADN dont une partie est complémentaire à celle du code-barre. Le sandwich est révélé par des particules en or de 13 nm greffées avec des brins d'ADN de séquences différentes de ceux immobilisés sur la puce mais complémentaires aux codes-barres. Les particules d'or sont utilisées pour leur forte absorbance dans le vert. En fonction du format du support d'analyse (présence ou absence de puits), la mesure est une simple mesure d'absorbance ou bien scanométrique. Ce test comporte de nombreux lavages, des

étapes complexes et dure environ trois heures.

Cette technique permet de détecter l'antigène prostatique spécifique (PSA) à une concentration de l'ordre de la picomole dans des milieux complexes tels que le sérum de mouton et descend à 170 fM si le sérum est dilué deux cents fois.

Récemment, une étape a été ajoutée après la mise en solution des codes-barres [43]. Elle consiste à amplifier le nombre de brins d'ADN en solution via une amplification en chaîne par polymérase plus connue sous le nom anglais de polymerase chain reaction (PCR) [44]. La détection de ces brins se fait toujours sur plaque à l'aide de particules d'or. L'exemple présenté ci-dessous vise la détection de la PSA.

La première étape est la préparation et la conception des sondes (A - figure 2.23) pour détecter la protéine PSA suite à l'amplification et l'identification des brins d'ADN (B). Typiquement, une solution aqueuse de particules magnétiques (MMP) fonctionnalisées avec des anticorps monoclonaux anti-PSA (50 μL à 3 mg/mL de solution de billes magnétiques) est mélangée avec une solution contenant la protéine PSA libre (10 μL) pendant 30 min à 37°C (Step 1). Un tube de 1,5 ml contenant la solution test est placé dans une microcentrifugeuse BioMag (Polysciences, Incorporated, Warrington, PA) à température ambiante. Après 15 s, le complexe MMP-PSA est concentré sur les parois du tube. Le surnageant (solution contenant des protéines de PSA libres) est éliminé et les particules MMPs sont resuspendues dans 50 μL à 0,1 M de tampon phosphate salin (PBS) (opération répétée deux fois). Les sondes NPs (pour une sonde NP de 13 nm de diamètre, 50 μL à 1 nM ; pour une sonde NP de 30 nm de diamètre, 50 μL à 200 pM), fonctionnalisées avec des anticorps polyclonaux anti-PSA et des brins d'ADN servant de codes-barres sont ajoutées à la solution test. Les NPs réagissent avec la PSA immobilisée sur les MMPs et délivrent leurs brins d'ADN pour amplifier le signal et identifier la protéine cible (Step 2). Cette solution est incubée 30 min à 37 °C. Les MMPs sont ensuite lavées avec du tampon PBS à 0,1M et isolées magnétiquement. Cette étape est répétée quatre fois, chaque étape dure 1 min, pour éliminer tous les interférants. Après le dernier lavage, les sondes MMPs sont resuspendues dans de l'eau NANOpure (50 μL) pendant 2 min pour deshybrider les brins d'ADN de la surface des nanoparticules. Grâce à l'utilisation d'un champ magnétique externe,

ces brins d'ADN sont facilement séparés et collectés (Step 3). Lors de l'amplification des brins d'ADN (Step 4), des brins d'ADN sont ajoutés au mélange pour la réaction de PCR (volume final : 20 μL) contenant les amorces appropriées. La solution est ensuite thermostatée cycliquement. L'amplicon des brins d'ADN est marqué avec du bromure d'éthidium et mélangé avec un gel-loading dye. L'électrophorèse sur gel ou la détection optique d'ADN est réalisée pour déterminer si l'amplification a eu lieu. Les amorces de l'amplification sont éliminées avec un contrôle approprié. Notons que le nombre de sondes NP par PSA est inconnu et dépend de la concentration de la protéine cible. Ainsi, une concentration en PSA comprise entre 300 fM et 3aM est détectée [44].

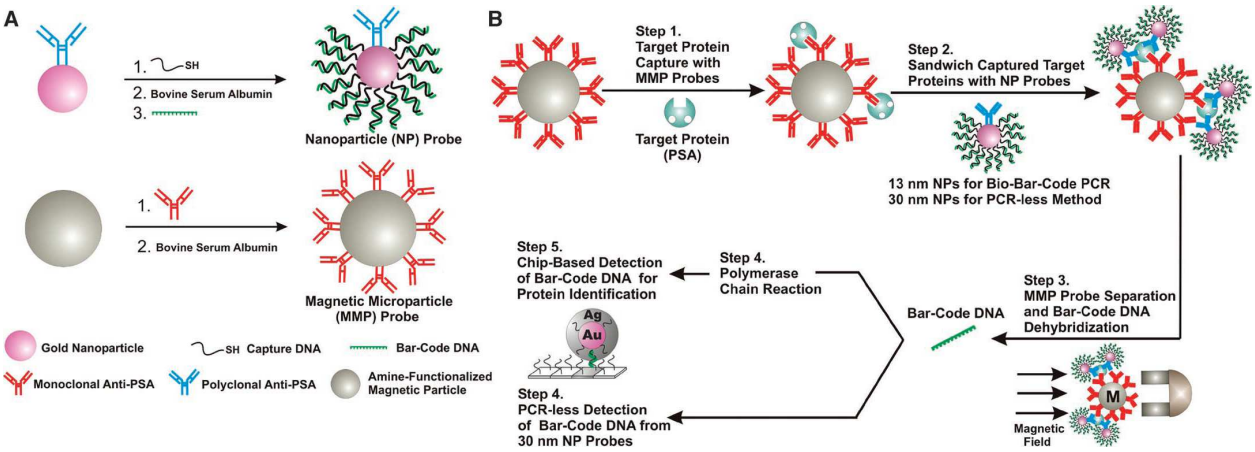


Figure 2.23 – Principe du test du code barre biologique avec l'étape de PCR [43].

Le protocole explicité ci-dessus, nous éclaire sur une chose : sa complexité. Ce test met en lumière l'habileté des scientifiques pour atteindre des seuils de détection très sensible. Malheureusement, ce but est au prix, pour le moment, d'une grande sophistication.

Ce procédé inventé par l'équipe de C. A. Mirkin a permis de créer la société Nanosphere et tente de percer le marché du diagnostic.

L'immobilisation de billes magnétiques sur la surface d'un capteur

L'utilisation de billes magnétiques en microsystème était pressentie par Philips comme très porteuse. Deux modes de détection ont été expérimentés. Le premier

se base sur la magnétorésistance géante (présenté au prochain paragraphe) et le deuxième, présenté ci-dessous, sur une détection optique.

L'innovation de ce test réside dans son format : la microfluidique et dans sa simplificité : l'absence de pompes externes pour véhiculer les fluides. En 2009, l'équipe de recherche du groupe Philips dirigée par M. Prins était capable de détecter une concentration inférieure à la picomole du marqueur cardiaque, la troponine I, en quelques minutes en milieu réel (sérum et plasma) selon le principe exposé figure 2.24. La photo(a) est une représentation schématique de la microchambre réactionnelle. La première étape (a1) consiste à hydrater les nanoparticules et le tampon puis à injecter l'échantillon à l'aide, par exemple, d'une simple micropipette . Les particules sont ensuite activées magnétiquement (a2) afin qu'elles réagissent avec les anticorps immobilisés à la surface. Tous les interférants, libres ou faiblement liés, sont éliminés de la surface de détection (a3). La chambre fluidique est placée dans un système de détection optique où la lumière réfléchie dépend de la quantité de billes immobilisées à la surface du détecteur. La photo (c) représente la puce fonctionnelle. Elle se compose de deux parties en plastique connectées par du scotch à double face. Ses dimensions sont 1 cm * 4 cm. Elle contient une entrée pour l'échantillon, une chambre réactionnelle et un échappement. Le volume total de l'échantillon injecté est de 10 μL mais seulement 1 μL est analysé. L'image (d) représente les billes magnétiques immobilisées sur la surface de détection. Cette surface de détection comporte 31 spots de 125 μm de diamètre permettant ainsi la détection simultanée de diverses antigènes. Le graphique (e) présente la courbe en temps réel du signal optique pour un unique spot. Trois phases sont présentes (a1, a2, a3). La modulation du signal en a2 est causée par l'interruption du champ magnétique.

Cette méthode est simple, rapide, sensible et quasiment entièrement intégrée. Elle correspond tout à fait au marché du point of care. Ce test devrait être bientôt mis sur le marché par Philips.

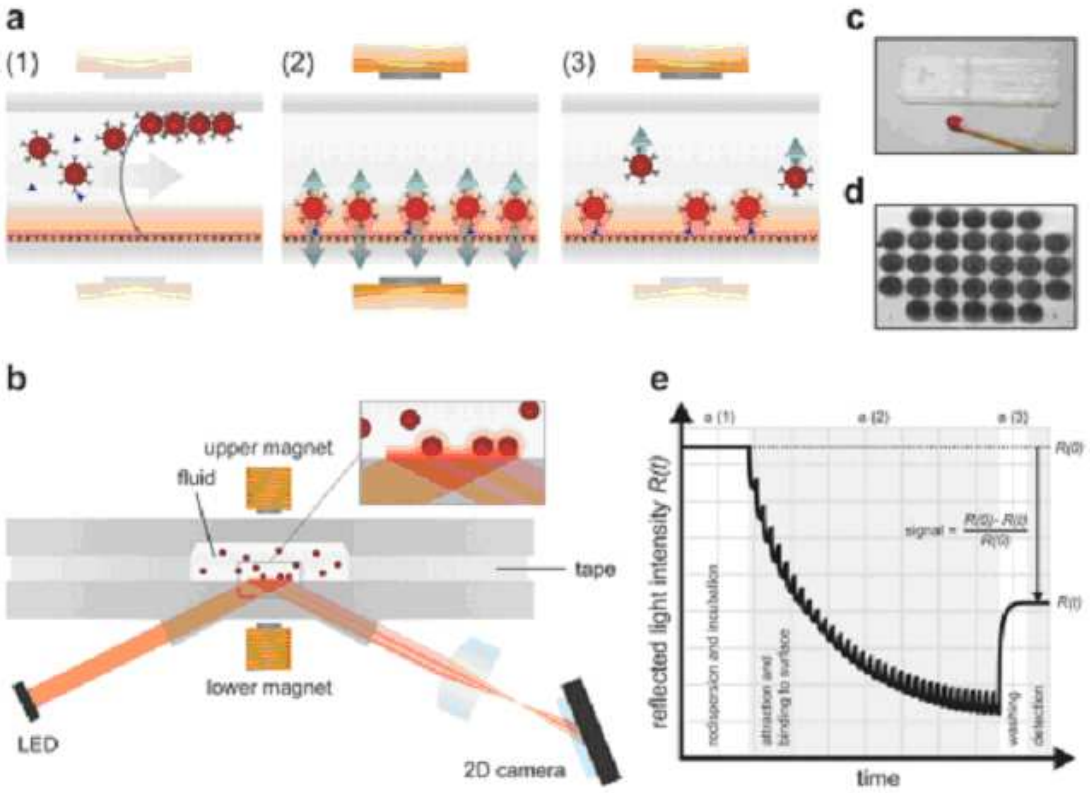


Figure 2.24 – Principe du test développé par Philips pour détecter une concentration inférieure à la picomole du marqueur cardiaque, la troponine I, en quelques minutes [45].

Détection magnétique par magnétorésistance géante

La magnétorésistance géante (GMR) est un effet quantique observé dans les structures de films minces composées d'une alternance de couches ferromagnétiques et de couches non magnétiques. Elle se manifeste sous forme d'une baisse significative de la résistance, observée sous l'application d'un champ magnétique externe. A champ nul, les deux couches ferromagnétiques adjacentes ont une aimantation antiparallèle car elles subissent un couplage ferromagnétique faible. Un champ magnétique externe induit un renversement d'aimantation ; les aimantations respectives des deux couches s'alignent et la résistance de la multicouche décroît brutalement. Ce phénomène de magnétorésistance géante est très utilisé

dans les têtes de lecture GMR des disques durs modernes. Ces capteurs à magnéto-résistance géante sont utilisés pour détecter la présence de particules magnétiques dues à la formation d'un complexe immun à leur voisinage (principe de la SPR) car ils s'affranchissent des effets de matrice.

Une puce microfluidique basée sur ce principe de détection a été développée par Philips. En 2005, l'entreprise avait publié un état de l'art de ce mode de détection [46]. Le protocole se décompose en deux étapes :

- capture primaire : test d'agglutination classique en volume entre des billes magnétiques de 350 nm de diamètre greffées avec des anticorps spécifiques à l'analyte et l'analyte.
- révélation : les billes magnétiques sont attirées vers la phase solide du puits où des anticorps spécifiques à l'analyte sont immobilisés. A cet endroit se situe également le détecteur GMR.

Le choix de la taille des billes était discuté. Une petite taille améliorait la sensibilité et une grande bille amplifiait le signal au détriment d'un possible écrantage d'analyte. Ce mode de détection a été jugé porteur par l'entreprise, à condition d'être intégré à une puce microfluidique. En 2006, Philips fabrique une puce intégrée basée sur la détection GMR. La sensibilité de cette puce est de trois billes de 300 nm de diamètre sur une surface de 1500 μm^2 [47]. En 2007, un test de dépistage de drogues est développé pour la sécurité routière [48]. Il est capable de détecter 10 ng/mL de morphine dans un échantillon de salive en une minute (figure 2.25) [49]. En 2010, cette puce est adaptée au diagnostic et est insérée dans un automate portatif et détecte un marqueur cardiaque, la troponine I, dans le plasma en cinq minutes.

Grâce à la détection magnétique, ce test s'affranchit des effets de matrice. La technologie mature des détecteurs GMR augmente la sensibilité de la mesure tout en restant peu onéreuse. Ce test a su rester simple malgré sa complexité apparente. Il est un très bel exemple d'intégration de système microfluidique. On est passé d'un appareillage de laboratoire encombrant, complexe et coûteux, à un dispositif portatif, simple et relativement bon marché.

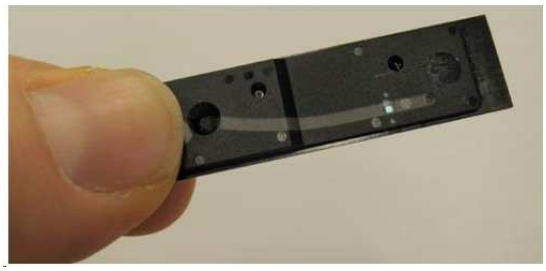


Figure 2.25 – Dispositif miniaturisé de détecteurs GMR pour révéler la présence de drogues dans des échantillons de salive.

2.3.3 Tests en développement

Certains tests utilisent des matériaux ou des méthodes de détection encore plus innovants, d'autres tentent de s'affranchir des problèmes cinétiques de reconnaissance ou de mettre au point de nouvelles stratégies de détection.

Les nouveautés "technologiques"

Les nanoparticules d'or adaptées à une dynamique de la lumière diffusée (DLS)

Les nanoparticules d'or ont été adaptées au test immunologique homogène et couplées à une dynamique de la lumière diffusée pour remonter à la taille et à la concentration des populations en solution. Ce test repose sur la formation d'un sandwich entre des nanoparticules. Ces nanoparticules sont, soit des sphères de 37 nm de diamètre, soit des nanotubes d'or de dimension 10 nm sur 40 nm. Les particules d'or ont l'avantage d'absorber fortement la lumière vers 520 nm. Elles sont greffées avec deux anticorps : un anticorps de détection et un anticorps de capture. Après une demi heure, ces particules s'agrègent spécifiquement à l'antigène (ici l'antigène prostatique PSA). Une simple mesure de l'intensité lumineuse permet de détecter 0,02 pM de PSA pour les particules sphériques et 0,4 pM pour les nanotubes [50]. Les nanoparticules ont également été mélangées afin d'amplifier le signal mais aucune réelle corrélation n'a été trouvée entre l'intensité moyenne diffusée et la concentration de PSA.

Cette technique est intéressante car elle permet d'accéder à des seuils de sensibilité très élevés par une simple mesure de la lumière diffusée. Ce test est rapide et peut être multiplexé par l'utilisation simultanée de différentes tailles ou formes différentes de nanoparticules. Néanmoins, un problème de stabilité colloïdale assez prononcé existe en présence de fluides biologiques.

Détection par résonance plasmonique de surface (SPR)

Afin d'améliorer la sensibilité de la SPR, l'équipe de H. J. Lee utilise des nanoparticules d'or pour amplifier le signal issu de l'interaction antigène-anticorps [51]. Ce test de détection se base sur la formation d'un sandwich avec l'analyte cible ici l'immunoglobuline E (IgE), tout comme le test ELISA, dans une chambre microfluidique. Les anticorps sont immobilisés sur une surface de dextran et l'analyte est injecté de manière continue à la surface de la puce. Les nanoparticules d'or viennent compléter ce sandwich pour amplifier le signal. La SPR est très sensible aux interactions non spécifiques entre la surface de dextran et les antigènes. Dernièrement, trois solutions ont été proposées par H. J. Lee pour réduire ces interactions non spécifiques :

- la fonctionalisation de la surface de la puce avec des polyethylènes glycols (PEG), une fois la puce greffée d'anticorps. Les interactions non spécifiques, mesurées à partir de la concentration en BSA fixée à la surface de la puce, sont réduites et cela d'autant plus que le polymère est grand
- l'utilisation de longues chaînes carbonées pour fixer l'anticorps à la surface. Cela permet d'augmenter l'accessibilité de l'anticorps vis à vis de l'analyte et ainsi augmente la constante d'affinité du couple. La valeur du coefficient d'adsorption de Langmuir, issu des fits des courbes représentant la phase d'association et de dissociation du complexe, représentant l'affinité du couple, est en effet plus élevée que celle donnée dans la littérature avec un système plus classique composé uniquement de petites chaînes d'alcanes
- le choix de la nature du ligand : anticorps ou aptamère

A travers ce test, un joli travail sur l'origine des intéractions non spécifiques et leur minimisation a été réalisé. Malheureusement, la complexité demeure. Cinq étapes sont nécessaires pour détecter la femtomole en 1h30 au minimum.

Détection par résonance plasmonique de surface localisée (LSPR)

Cette méthode de détection se base sur la détection d'ondes plasmons à la surface d'une structure métallique de taille nanométrique. Les nanoparticules en métal absorbent fortement dans l'UV-visible contrairement au bloc métal. Le changement local de l'indice de réfraction causé par la présence de molécules à la surface de la particule déplace la bande d'absorption. L'utilisation de matériaux de taille et de forme parfaitement maîtrisées est essentielle pour garantir une bonne sensibilité (figure 2.26).

L'équipe de M. Duyne a utilisé des nanoparticules d'argent de forme triangulaire (100 nm de large et 51 nm en hauteur) pour détecter la streptavidine [52]. Ces nanoparticules sont fonctionnalisées avec des groupements carboxylate pour greffer de façon covalente la biotine. Le taux de greffage de ces deux étapes est contrôlé en mesurant le déplacement de la bande d'absorption. Ainsi, avec un taux de greffage de biotines compris entre 60 et 3000 sites, la picomole de streptavidines est détectée en 3 heures. Cette concentration correspond à environ 25 streptavidines par particule, synonyme d'une réactivité assez faible des particules. D'autres systèmes ont également été testés. Il s'avère que cette méthode de détection est sensible au poids moléculaire des protéines. Le signal issu des plasmons de résonance dépend en effet grandement de la densité de surface. Ainsi les « grosses » molécules, molécule ayant un poids moléculaire élevé, sont détectées de manière plus sensible que les petites molécules.

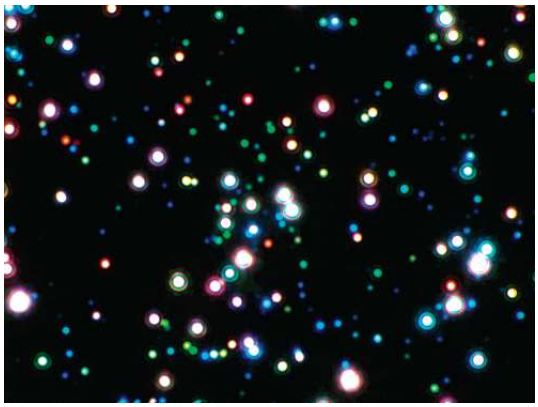


Figure 2.26 – Image optique des nanoparticules d'argent (dimension : 130×170 μm^2)

Cette technique a une résolution spatiale de la nanoparticule, détecte de petites molécules et permet le multiplexage. Pour l'instant, sa sensibilité reste inférieure à celle de la SPR principalement à cause de la valeur de l'indice de réfraction des nanoparticules (100000 fois plus petit). Mais, potentiellement cette technique permet de détecter une centaine de molécules par nanoparticule [53]. De plus, elle est plus simple (pas de contrôle en température) et meilleur marché (50000 au lieu de 150000 dollars) que la méthode SPR.

Cette méthode reflète la complexité de la miniaturisation des tests de diagnostic. En effet, la manipulation d'objets colloïdaux facilite l'intégration du test, l'accession à des seuils de sensibilité très grands en un temps court mais tout cela au détriment du signal.

Détection magnétique par magnétorésistance géante

En laboratoire, l'équipe de S. X. Wang détecte la femtomole de l'antigène embryonnaire de carcinome sans amplification et 50 attomoles en utilisant plusieurs billes magnétiques par sandwich [54]. La gamme de mesure s'étend sur six décades. Ces performances ne sont pas altérées en milieu plus complexe tel que le sérum de mouton dû à la faible adsorption non spécifique de protéines. De plus, le détecteur GMR s'avère peu sensible aux variations de pH et de turbidimétrie. Un simple algorithme permet de s'affranchir des fluctuations de température. Il est également possible de détecter simultanément huit différents marqueurs tumoraux en milieu tamponné mais également dans du sérum de mouton et dans du tampon de lyse avec des performances très proches pour une concentration assez élevée de 10 ng/mL soit environ 100 picomoles.

Ceci montre le potentiel de cette nouvelle méthode de détection.

Détection électrique par mesure pluviométrique

De façon générale, le principe des transducteurs potentiométriques est basé sur la mesure d'une différence de potentiel entre deux électrodes. Il repose sur l'utilisation de la loi de Nernst qui permet de corréler les variations de potentiel observées à la concentration des espèces ioniques en solution.

Le principe de la technique consiste à utiliser les variations de charges de surface d'une électrode appelée grille pour modifier le courant traversant le transistor.

Récemment, cette technique de mesure a été intégrée à une nanostructure : les nanofils pour augmenter son seuil de détection.

Un nanofil est un matériau caractérisé par un diamètre ou une épaisseur de taille nanométrique et une longueur sans contrainte. A ces échelles, les effets quantiques sont importants. Les électrons confinés latéralement, occupent des niveaux d'énergie différents de ceux traditionnels ou de ceux des matériaux en bloc.

Grâce à ce confinement quantique, des valeurs discrètes de la conductance électrique apparaissent facilitant ainsi le transfert des électrons. Ce transfert d'électrons est orchestré et détecté par l'utilisation d'un transistor à effet de champ complémentaire intégré dans le nanofil.

La mise en oeuvre de ce système demande actuellement beaucoup d'efforts en raison de la jeunesse de cette technologie. Néanmoins, elle se prête parfaitement à une intégration complète.

La surface des nanofils en silicone est greffée avec des anticorps, ici avec de la biotine [55]. L'ajout de streptavidine dans le milieu réactionnel provoque une augmentation du courant car la streptavidine est une molécule chargée négativement dans les conditions de pH. Au bout de 40 s, l'intensité se stabilise autour d'une valeur supérieure à celle initiale, révélant la formation et l'équilibre de la réaction de reconnaissance spécifique entre la streptavidine et la biotine. Pour une protéine chargée positivement, par exemple l'avidine, l'intensité chute. En jouant sur le pH, on peut amplifier le signal. Plus le milieu a un pH éloigné du point isoélectrique de la protéine à détecter, plus l'intensité variera lors de la formation du complexe. Une solution contenant 10 femtomoles de streptavidine est détectée avec un signal sur bruit de 140, impliquant une détection limite de 70 attomoles en quelques minutes. La détection d'anticorps est également possible autour de 100 femtomoles.

Cette technique est très sensible et offre la quantification en temps réel d'un analyte tout comme la SPR. Cependant elle reste soumise à la diffusion des espèces. Le temps du test sera ainsi de plus en plus long aux faibles concentrations en antigènes.

Les nouveaux formats

Les tests immunologiques ont énormément profité des bénéfices liés à la miniaturisation offerte par les systèmes microfluidiques. Cette nouvelle échelle permet de réduire la quantité en réactifs, souvent coûteux, ainsi que le temps d'analyse en raison des très faibles volumes engagés (quelques microlitres) [56]. Plusieurs équipes ont adaptés les tests immunologiques au format microfluidique afin de réduire le temps de reconnaissance antigène-anticorps qui devient limitant aux très faibles concentrations d'antigènes. Ces tests utilisent des billes magnétiques en raison de leur faciliter de manipulation via l'application d'un champ magnétique extérieur [57, 56, 58]. Malheureusement, la sensibilité obtenue reste assez faible ; de l'ordre de la cinquantaine de nanomoles.

L'équipe de M. Gijs [59] a réussi à atteindre la picomole en un temps court (10 minutes) sur le système modèle streptavidine/biotine via une simple puce microfluidique. Ce test joue sur les barrières cinétique et thermodynamique de la réaction antigène-anticorps. Des billes magnétiques de 1 μm de diamètre sont retenues localement au niveau des pointes magnétiques, occupant ainsi un très faible volume. Ce confinement augmente la concentration en anticorps ce qui joue sur la barrière thermodynamique (concentration de complexe formé). Elles sont ensuite agitées pour capturer efficacement l'analyte (figure 2.27). Une fois la phase de capture terminée, le champ magnétique est coupé, les billes vont pouvoir s'agréger spécifiquement entre elles. La détection se fait par microscopie. Ce système permet de concentrer à souhait un échantillon avant de procéder à la détection et également de "laver" les billes de tout interférant avant la phase d'agglutination spécifique. Ce test sera détaillé et caractérisé plus en détails dans notre quatrième chapitre.

Les nanomatériaux catalysant la réaction de chimiluminescence

Cette ancienne technique a fait l'objet d'améliorations au niveau de la catalyse. La présence de catalyseur permet d'accélérer la production de lumière en diminuant la barrière énergétique de la réaction entre les réactifs. Ces dernières années, l'utilisation de nanomatériaux comme catalyseur s'est développée.

Récemment, les travaux menés par J. Li. ont montré que des particules irré-

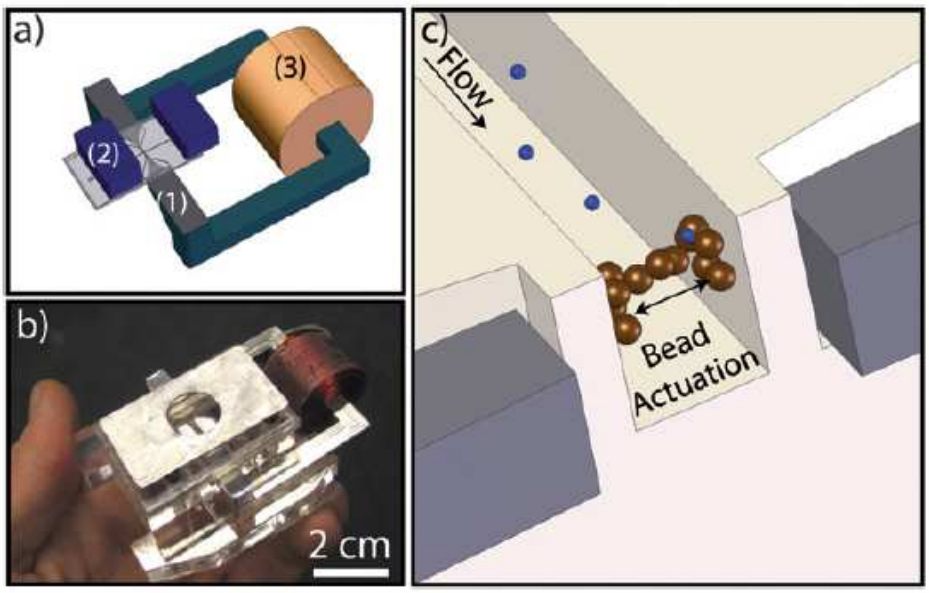


Figure 2.27 – (a) Vue schématique de la puce microfluidique et du système magnétique comprenant deux pointes magnétiques (1), deux aimants permanents (2) et une bobine (3). (b)Photographie du système entier. Les aimants permanents sont placés sous une plaque de fer située au dessus du système. (c) Vue schématique en 3D du déplacement des particules à travers le canal microfluidique (l 100 $\mu m \times L100\mu m \times h100\mu m$) entre les pointes magnétiques et la percolation de la solution d'analyte [59].

gulières d'or (Au (III)), de 50 nm de taille moyenne avec une dispersion allant de 25 à 30 nm, amplifient l'activité catalytique du luminol [60]. Cette amplification de lumière est 100 fois supérieure à celle émise lors des tests classiques basés sur l'utilisation de particules d'or sphériques, régulières de 25 nm diamètre. Les nanoparticules irrégulières d'or fonctionnalisées par des anticorps anti-analyte révèlent la présence de l'analyte. Cette méthode de révélation est peu sensible au non spécifique ce qui permet de s'affranchir de la dernière étape de lavage avant révélation. Typiquement, en présence de plasma, il a été montré que l'on pouvait détecter 17 pmol/L d'IgG (anti-humain).

Ce nouveau test montre le potentiel des nanotechnologies sur l'amélioration des performances des tests de diagnostic sans recourir à de nouvelles méthodes complexes et coûteuses.

Les polymères fluorescents conjugués avec des nanoparticules d'or

Les marqueurs fluorescents présentent un certain nombre de limitations. La première limitation provient de l'autofluorescence des fluides biologiques limitant grandement la sensibilité de la mesure. La deuxième limitation est le phénomène de "quenching" qui résulte de l'absorption d'une partie de l'énergie par les autres molécules situées à proximité dans le milieu. Le troisième phénomène, appelé photoblanchiment, caractérise la perte des propriétés fluorescentes des molécules sous l'effet d'une excitation par une forte intensité lumineuse. L'énergie absorbée par les molécules peut provoquer des réactions chimiques qui altèrent de façon irréversible les propriétés de fluorescence.

Le principe de ce test repose sur l'utilisation de nanoparticules d'or conjuguées de manière non covalente à des polymères fluorescents permettant de détecter, d'identifier et de quantifier les protéines cibles [61]. Ce test tire profit d'une limitation des molécules fluorescentes : le phénomène de "quenching".

Les nanoparticules d'or sont utilisées pour leur caractère sélectif envers la protéine cible et leur capacité à absorber l'énergie libérée par le polymère fluorescent ("quenching"). Leur physicochimie est importante car elle conditionne la stabilité des colloïdes et la reconnaissance spécifique envers la protéine cible.

Ces particules, de deux nanomètres de diamètre, sont composées d'un coeur métallique hydrophobe pour leur stabilité (ici l'or), d'une couche d'oligoéthylène glycol (OEG) pour sa résistance à l'absorption non spécifique de protéines (molécules d'eau pénètrent dans la couche de OEG) et d'une surface chargée pour faciliter les interactions avec les protéines. La charge de la surface est fonction de la protéine à détecter. Si la protéine est chargée positivement, la nanoparticule sera négative.

Les nanoparticules d'or sont préférées à celles d'argent en raison de leur extraordinaire stabilité, de leur forte interaction avec les groupements amines (présents sur les résidus de lysine, un des acides aminés le plus courants constituant des protéines) qui promeut les interactions spécifiques et de leur forte capacité à absorber le photon émis par le polymère.

Le principe de ce test est simple contrairement à la préparation des réactifs.

Dans un premier temps, ces nanoparticules, chargées positivement (pour détecter des protéines chargées négativement), sont liées au polymère fluorescence, chargé négativement. Ces interactions électrostatiques (peu spécifiques) donnent lieu à une constante d'adhésion (Ks) dépendant directement de la nature chimique de la surface de la nanoparticule et du polymère. En présence d'une protéine, deux cas sont possibles. Le premier cas est la formation d'un complexe nanoparticule/protéine si les interactions entre la nanoparticule et la protéine sont plus fortes qu'entre la nanoparticule et le polymère. Cette séparation entre la particule d'or et le polymère provoque l'émission de fluorescence. Dans le cas contraire c'est-à-dire une faible interaction entre la nanoparticule et la protéine comparée à celle entre la nanoparticule et le polymère, le complexe nanoparticule/polymère reste en solution, aucune émission de lumière n'est enregistrée. La spécificité de la reconnaissance est maitrisée par l'état de surface des nanoparticules et du polymère fluorescent (plus ou moins chargé). En jouant sur la constante d'adhésion de ces derniers, diverses protéines peuvent être identifiées. La quantification des protéines se fait quant à elle via une simple mesure d'absorbance à 280 nm à condition que le polymère fluorescent n'absorbe pas dans ce domaine. Ainsi l'absorption de lumière est due à la présence du tryptophane et de la tyrosine, acides aminés constituant les protéines. Cette mesure est peu précise.

Ces mesures sont certes simples et rapides mais elles nécessitent une phase de préparation importante. Tout d'abord, la physicochimie de ce test est compliquée et nécessite une nouvelle étude pour chaque nouvelle protéine. De plus, d'importants étalonnages sont nécessaires. D'une part pour déterminer la quantité de polymères fluorescents à ajouter par rapport à la quantité de protéines à détecter. D'autre part, pour calibrer la quantité de lumière absorbée par rapport à la nature de la protéine, qui est fonction de la quantité de tryptophane et de tyrosine propre à chaque protéine. La lecture de la réponse est complexe et indirecte. Il faut regrouper les données de fluorescence, en rapport avec la sélectivité, la nature de la protéine via la valeur du Ks et celles d'absorbance pour la quantification. Cette technique permet d'identifier la nanomole de protéines inconnues en milieu non complexe avec une précision de 94.2 % sur 52 échantillons et de les quantifier

à $\pm$ 5 %.

Cette méthode est intéressante non pas au niveau des performances atteintes (assez faibles) mais car elle n'utilise pas d'anticorps pour détecter des protéines. Cette voie est très peu expérimentée. A travers cette expérience, on s'aperçoit qu'un effort important au niveau de la chimie est nécessaire pour concurrencer l'efficacité des anticorps. Le vivant n'est pas si facile à imiter !

2.4 Conclusion

Les tests de diagnostic ont toujours fait l'objet d'intensives recherches en vue d'augmenter principalement leur sensibilité. Aujourd'hui, cet objectif est atteint en détectant la femtomole. Certaines équipes cherchent à dépasser ce seuil pour descendre jusqu'à la zeptomole [52]. A cette concentration (10^{-21} M), le nombre de particules par millilitre est inférieur à l'unité, la préparation de l'échantillon est alors primordiale car la perte d'une seule molécule peut fausser le résultat. Pour les utilisateurs, les aspects à prendre en compte sont la simplicité et la rapidité d'analyse à moindre coût tout en conservant une grande sensibilité. Parmi les tests précédemment cités, les tests immunochromatographiques et sur papier se distinguent nettement par leur grande simplicité et leur maturité. Cependant des efforts restent à produire concernant leur sensibilité.

Afin de répondre aux nouvelles orientations du marché du diagnostic, nous avons choisi d'améliorer la limite de détection du test d'agglutination mis au point au LCMD en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de son caractère intégrable. Ce travail nous a mené à changer de format de billes et de méthode de détection. Pour des raisons cinétiques, nous avons également changé de format fluidique en optant pour la microfluidique. A travers notre étude bibliographique, ce choix laisse supposer une réduction des quantités de réactifs (diminuant les coûts), une activation simple et rapide d'un processus complexe et enfin une facilité de transport.

Chapitre 3

La sensibilité du test d'agglutination magnétique : compréhension et amélioration

Comme nous avons pu le constater, les tests immunologiques font appel à de nombreuses disciplines (immunologie, chimie, physique, physico-chimie, ingénierie...) et très souvent, seules les dernières technologies de ces différents domaines, sont mises en commun lors de la création d'un test. Cette finalité apparait comme complexe, longue et très concurrentielle. Loin de ce contexte, un test d'agglutination magnétique basé sur des concepts simples a été développé au laboratoire. Ses performances ont déjà séduits deux industriels. Il détecte la picomole en une dizaine de minutes via une détection turbidimétrique. L'amélioration de sa sensibilité tout en conservant sa simplicité s'avère actuellement être un objectif très porteur. Mon travail a consisté à étudier et à comprendre les facteurs jouant sur sa sensibilité en vue de son amélioration.

Au cours de ce travail, j'ai encadré deux stagiaires : H. Gouthière (étudiante en 3^{eme} année à l'ESPCI) et D. Lefebvre de Rieux (étudiant Master II en Bioingénierie). Leur nom est associé aux expériences qu'ils ont menées.

Un résultat appartient au travail d'un post doctorant du laboratoire M. de Geus.

Dans la suite de mon exposé, je vais généraliser les résultats obtenus sur le système modèle streptavidine/biotine à tous les couples antigènes/anticorps. Ce raccourci est en partie justifié par l'expérience acquise au laboratoire sur les systèmes biologiques. En effet, dans nos expériences, seule la constante cinétique d'association des couples antigène/anticorps est considérée. Or elle est identique pour tous les complexes réels et modèles.

3.1 Les facteurs de la sensibilité

La sensibilité d'un test immunologique représente la limite de détection (DL) pour un certain rapport signal/bruit. Par convention, ce rapport est fixé à 3 et le bruit (σ) correspond à la variation de signal de l'échantillon témoin c'est à dire sans antigène. Si on fait l'hypothèse que le bruit suit une loi normale dont la densité de probabilité est représentée par une fonction gaussienne où σ représente l'écart type, alors en reportant la valeur équivalant à 3 σ sur la droite de dosage, on estime couvrir 99,7 % des évènements liés à l'agglutination non spécifique (figure 3.1). A la limite de détection de rapport 3, le risque de faux positif s'élève à 0,03 %.

Deux facteurs jouent donc sur la limite de détection (DL) :

- le bruit σ
- la pente de la droite

Un gain en sensibilité signifie une baisse de la DL soit en diminuant le bruit (figure 3.2a), soit en augmentant la pente de la droite (figure 3.2b).

Le traitement du signal optique mesuré peut également améliorer la sensibilité d'un test mais cette voie ne sera pas étudiée. Elle correspond à la dernière phase optimisable et optimisée pour un test. Elle améliore généralement la sensibilité de quelques pourcents.

Dans un premier temps, nous allons étudier les paramètres à l'origine du bruit afin de mieux le minimiser. Ensuite, nous nous attacherons à amplifier le signal pour augmenter la pente de droite.

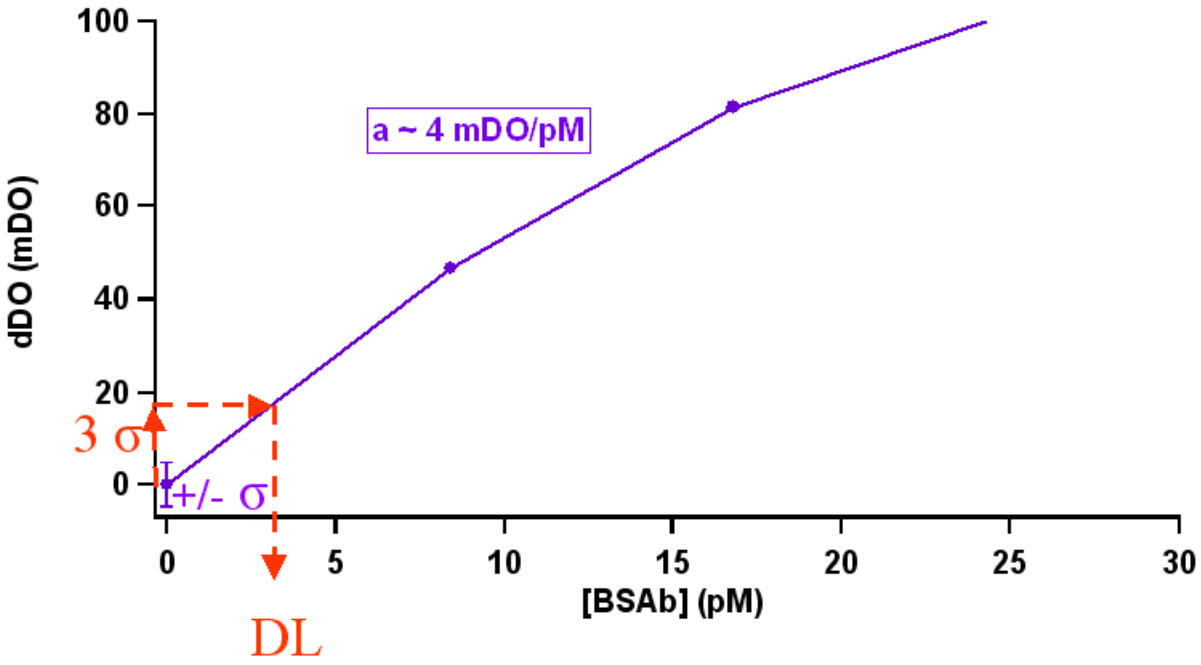
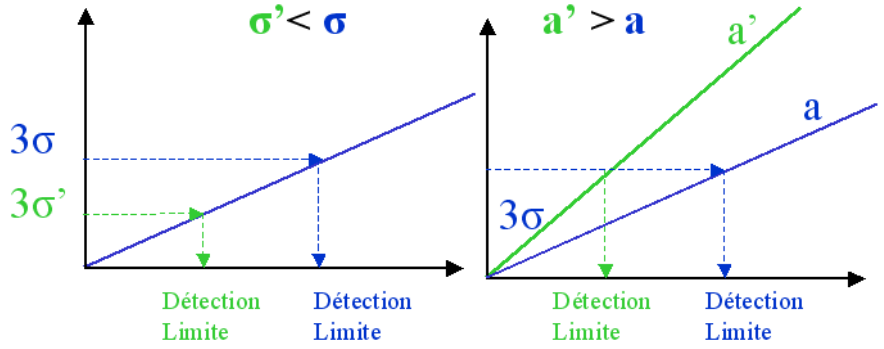


Figure 3.1 – Représentation schématique de la méthode de détermination de la détection limite (DL) sur le système modèle streptavidine/biotine, [billes] = 70 pM et σ = 4,77.



(a) Effet du bruit **(b)** Effet de la pente de la droite

Figure 3.2 – Représentation schématique des paramètres jouant sur la DL. σ : écart-type et a : pente de la droite

3.1.1 Le bruit

Dans cette partie, le bruit représente la variabilité de signal de l'échantillon témoin. Ce bruit a deux origines :

- l'appareil de mesure
- le système colloïdal

Sous le terme "appareil de mesure", on sous-entend reproductibilité d'une mesure de DO. Cette reproductibilité varie suivant les appareils et la gamme de mesure. Cette valeur sera déterminée pour chacun des appareils utilisés car elle détermine la sensibilité maximale atteignable. Pour cela, plusieurs mesures de DO sont réalisées avec une solution colorante pour avoir la même DO initiale que les solutions contenant les billes magnétiques.

Le deuxième point concerne le système colloïdal c'est à dire les billes et le milieu réactionnel. La formulation a bien évidemment un rôle sur la stabilité colloïdale mais elle ne sera pas étudiée car elle n'est pas générique et nécessite d'être optimisée pour chaque nouveau système. Nous allons plutôt nous attacher au rôle des billes et plus particulièrement à leur nombre. En faisant varier cette population, nous allons pouvoir quantifier sa réelle influence sur le bruit.

Influence du nombre de billes

Dans cette partie, les billes sont fonctionalisées identiquement avec une centaine de protéines.

D'après les résultats obtenus au laboratoire (chapitre II section 2.3), le signal est relié au nombre d'antigènes en solution. Autrement dit, le nombre de doublets spécifiques correspond au nombre d'antigènes. Ainsi, ce nombre est fixe pour une concentration en antigènes donnée et doit être supérieur à celui issu de l'agrégation non spécifique pour être détecté. Intuitivement, une relation de proportionnalité peut exister entre le nombre de billes et le nombre d'agrégats non spécifiques présents après application du champ magnétique. Le nombre de billes jouerait alors sur le taux d'agglutination non spécifique et sa reproductibilité (qui traduit l'écart-type σ) alors que le bruit optique est fixe et indépendant du nombre de

billes.

Une étude préliminaire au niveau du champ magnétique appliqué est nécessaire afin de s'assurer de la présence de chaînes dans l'échantillon à de faibles concentrations de billes lors de la deuxième étape du test d'agglutination. Cette formation de chaînes est très importante car elle permet de révéler la présence des antigènes en solution.

étude préliminaire

La valeur du champ magnétique permettant de "chaîner" les particules dépend de la distance entre les particules -paramètre fixé par leur concentration - et du rapport de la force magnétique sur l'agitation thermique appelé λ [62]. Nous avons suivis la variation de DO au cours du temps sous champ de 30 mT pour différentes concentrations de billes. La DO a été normalisée par le nombre de billes afin de s'affranchir des différences de signal uniquement liés aux nombres de billes (figure 3.3) car plus le nombre de billes est élevé plus la DO est grande.

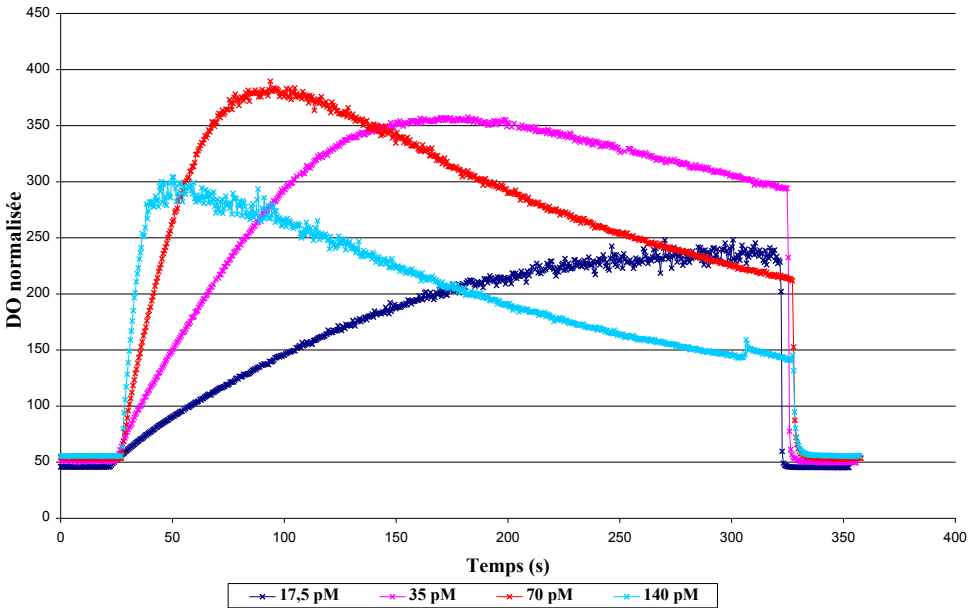


Figure 3.3 – Evolution de la densité optique normalisée par la fraction massique de billes pour différentes concentrations de billes non greffées (billes COOH) 17,5 ; 35 ; 70 et 140 pM sous un champ magnétique de 30 mT pendant 5 min. Expérience réalisée par H. Gouthière. La mesure de densité optique est effectuée à 632 nm.

Sur l'échelle de temps observée (300 s), les courbes se répartissent en deux familles. Aux faibles concentrations de billes ($<$ 17,5 pM), la DO augmente rapidement avec le temps. Pour des plus fortes concentrations en billes ($\geq$ 35 pM), la DO passe par trois phases. Une phase linéaire croissante de pente aiguë qui est fonction de la concentration en billes, une phase rapide de saturation et enfin une diminution constante dont la pente est également fonction du nombre de billes. La première phase correspond à la formation de chaines suivant les lignes de champ. La pente reflète le temps de chaînage. Plus le nombre de billes est important, plus la formation de chaines est rapide. La deuxième phase, phase de saturation, est due à la superposition de deux phénomènes : la formation de chaines (première phase) et l'agrégation latérale de ces chaines (troisième phase). Le chainage latéral a lieu de plus en plus tôt avec une forte concentration en billes. Durant cette phase, les billes sont concentrées très localement provoquant une diminution de l'intensité diffusée (ce phénomène sera explicité dans le paragraphe 3.1.2) d'où la chute de la DO.

Pour la suite de nos expériences, seule la formation de chaines, révélée par l'augmentation de la DO, est importante. Ce phénomène ayant été observé pour chacune des concentrations testées, nous sommes assurés de la bonne réactivité du test d'agglutination magnétique pour des concentrations en billes allant de 17,5 à 140 pM. Pour des concentrations en billes encore plus faibles, le champ magnétique peut être augmenté afin de s'assurer de la présence de chaînes. Pour la suite des expériences, le champ magnétique est appliqué pendant 10 minutes.

Expérience

Le signal mesuré correspond à l'agrégation non spécifique relevée par la variation de densité optique après et avant champ en absence d'antigène. Dans un premier temps, l'expérience est faite sur des billes de 200 nm non greffées (-COOH) afin d'avoir une mesure la plus absolue possible - minimisation des problèmes de stabilisation colloïdale dus à la présence de protéines à la surface de la bille. La formulation a été légèrement adaptée aux billes carboxyliques afin d'obtenir une faible variation de signal en absence d'antigènes c'est-à-dire une bonne stabilité colloïdale en présence de champ magnétique. La force ionique est diminuée à 100

mM, le pH à 6,7 et le surfactant est à 0,4 % en masse en raison de l'absence de protéines à la surface des billes (figure 3.4). Le système optique utilisé est composé d'une lampe à incandescence halogène et d'un photomultiplicateur (PMT) comme détecteur. Il est choisi pour sa grande stabilité optique.

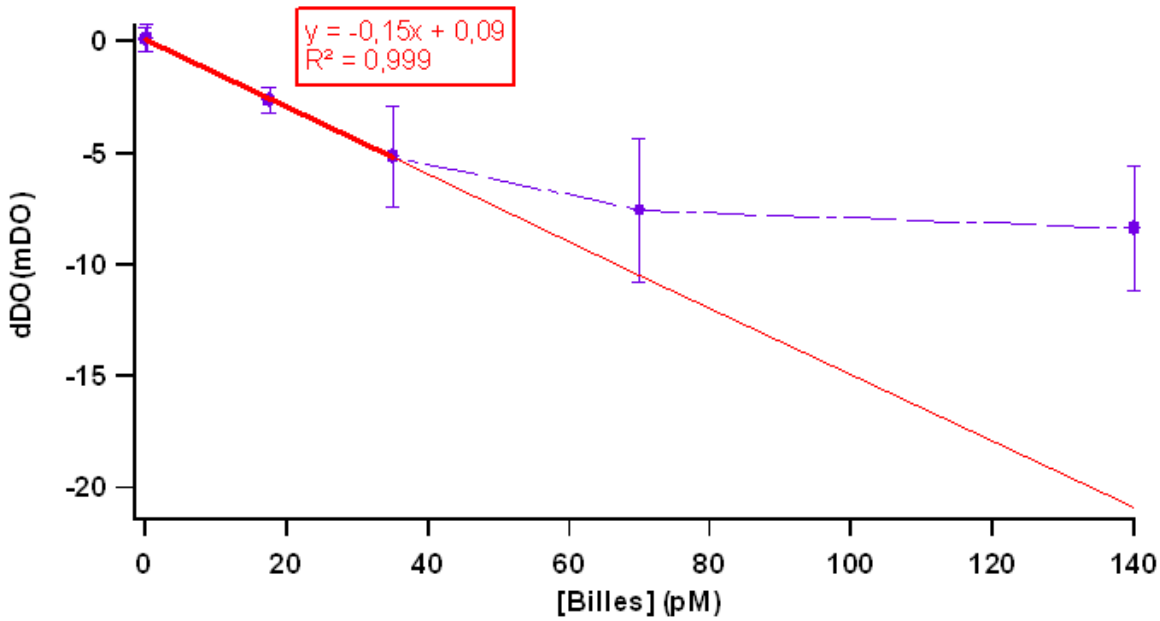


Figure 3.4 – Evolution de la variation de densité optique en fonction de la concentration de billes COOH après un champ de 30 mT pendant 10 min. Le milieu d'analyse est du tampon phosphate à 100 mM, pH= 6,7 avec 0,4 % de F-127. Toutes les mesures sont réalisées trois fois.

Afin de s'assurer de la réelle mesure du bruit issu des billes et non de l'appareil de mesure, une première mesure sans bille est réalisée. Une variation de DO de 0,05 mDO avec un écart-type de 0,5 mDO est obtenu. Comme souhaité, le système optique est très stable. Les expériences peuvent être réalisées.

Les résultats obtenus sont présentés figure 3.4. La variation de DO est négative due à la dérive qui s'observe également sans champ. Cela reflète l'influence de la formulation du milieu sur les billes. Lorsqu'elles sont injectées dans le milieu d'analyse, quelques minutes sont nécessaires pour rééquilibrer les conditions physico-chimiques : par exemple, des protéines peuvent s'absorber à la surface des

billes modifiant leur indice de réfraction. Cette dérive est modélisée et représentée en rouge sur la figure 3.4. Elle est constante (pente de -0,15) et proportionnelle aux billes. Pour cette expérience, les mesures de DO ont été effectuées directement après mélange des réactifs. Une étape d'incubation permettrait d'éliminer cette dérive. Afin de s'affranchir de ce phénomène, la dérive est soustraite aux données (figure 3.5).

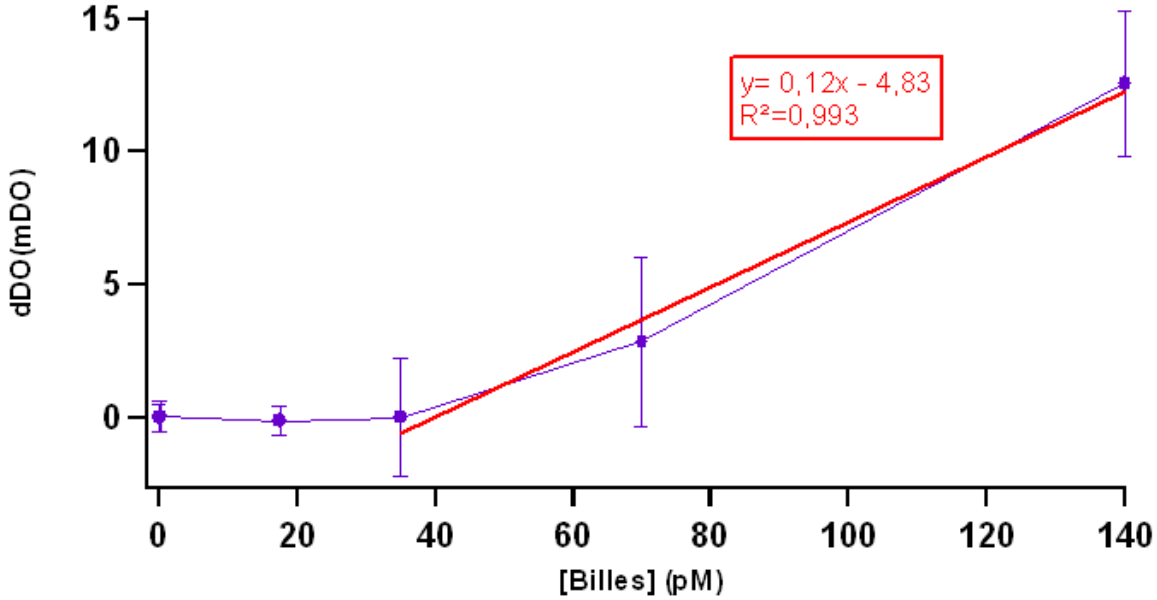


Figure 3.5 – Evolution de la variation de densité optique normalisée par la dérive en fonction de la concentration de billes COOH après un champ de 30 mT pendant 10 min. Le milieu d'analyse est du tampon phosphate à 100 mM, pH= 6,7 avec 0,4 % de F-127. Toutes les mesures sont réalisées trois fois.

En dessous de 35 pM de billes, aucun signal est enregistré. Nous sommes dans le cas où le signal émis par les doublets est inférieur à la sensibilité de la mesure turbidimétrique. Au delà de cette concentration, les agrégats présents sont détectés et leur présence est proportionnelle à la quantité de billes. Dans cette gamme, un dixième du signal est dû à la concentration de billes (pente = 0,12). L'écart-type n'est pas affecté (constant proche de 3%) car les valeurs sont assez faibles sur cette gamme. Ainsi, la quantité de billes a une influence sur le signal non spécifique et sa reproductibilité (σ).

Maintenant, regardons ce qui se passe lorsque ces billes sont greffées et plaçons nous dans les conditions réelles d'utilisation. Pour cela, nous utilisons l'appareil portatif (KIM) développé par Bertin Technologies et les billes provenant de leur kit contrôle positif. Ce kit est utilisé pour valider la bonne formulation du milieu d'analyse lors des missions sur le terrain. Ce système est moins précis qu'un système de laboratoire car il s'agit d'un équipement transportable pour réaliser des analyses sur le terrain. Il doit d'abord être robuste et donner des résultats dans un temps court. Plusieurs concentrations de billes sont testées en milieu tamponné (figure 3.6).

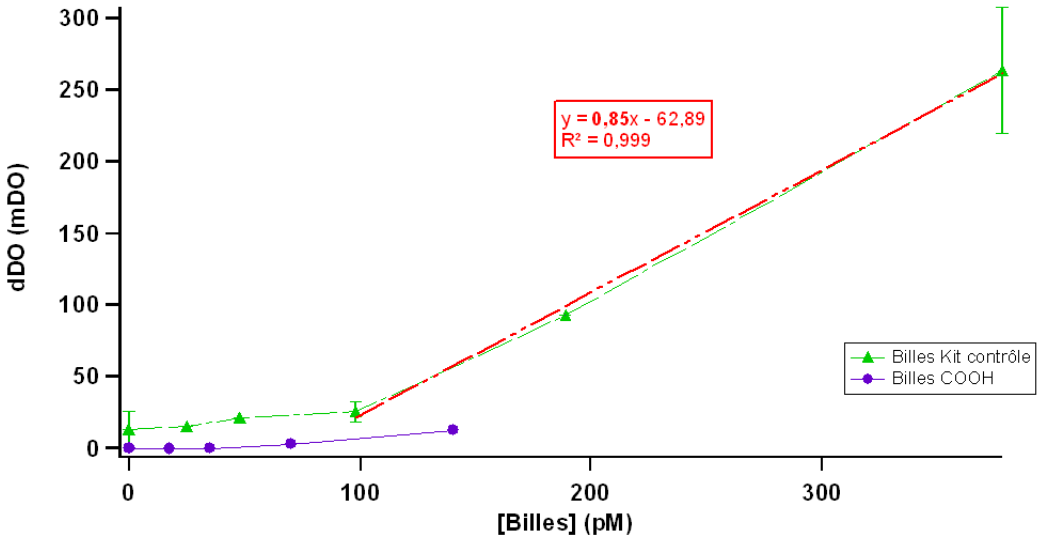


Figure 3.6 – Evolution de la variation de densité optique en milieu tamponné (formulation non renseignée) en fonction de la concentration en billes après un champ de 30 mT pendant 10 min. Les billes sont issues de kit contrôle positif développé par Bertin Technologies. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

Le système de mesure portatif est nettement moins stable que celui précédemment utilisé. Pour quatre essais successifs réalisés sans bille, le signal est autour de 13 mDO avec un écart-type de 13 mDO.

Pour des concentrations en billes inférieures à 100 pM, le signal est quasiment constant, aux alentours d'une trentaine de mDO. Cette valeur semble correspondre à la limite de sensibilité de l'appareil de mesure (13 mDO + 13 mDO) et non aux

billes. Au delà de 100 pM de billes, le signal ainsi que l'écart-type varient très fortement avec la concentration de billes (pente proche de 1) et sont très supérieurs à ceux enregistrés avec les billes non greffées (-COOH). Sur 9 mesures, l'écart type s'élève à 7 mDO avec 100 pM de billes et à 44 mDO avec quatre fois plus de billes. La limite de détection avec 400 pM de billes est alors environ six fois plus grande qu'avec 100 pM de billes (DL proportionnelle à 3 σ). Ainsi, un nombre élevé de billes diminue la sensibilité. De plus, d'après les résultats obtenus, on constate une relation de proportionnalité entre le signal et le bruit associé à ce signal. Le bruit représente environ 15 % du signal.

La superposition des résultats obtenus sur les billes non greffées et les billes issues du kit contrôle positif du KIM, présentée figure 3.6, montre que la présence d'anticorps sur les billes augmentent le bruit de la mesure.

Deux phénomènes jouent alors sur le bruit et par ricochet sur la sensibilité : le nombre de billes et la présence d'anticorps sur les billes. Pour un nombre fixe d'anticorps, un faible nombre de billes diminue le bruit. Le nombre minimal de billes est fixé par la limite de sensibilité de l'appareil de mesure. Dans le cas du KIM, la sensibilité de l'appareil nécessite de travailler avec une concentration en billes supérieure ou égale à 100 pM afin de sortir du bruit de l'appareil. Concernant l'état de surface des billes, nous savons que la stabilité colloïdale est encouragée par un petit nombre d'anticorps par bille. Comme il s'agit de test immunologique, il faut s'assurer que cette quantité est suffisante pour former un complexe.

L'impact de cette concentration va être étudiée lors de l'optimisation du signal.

3.1.2 La pente de la droite

Comme nous l'avons explicité au chapitre II section 2, la pente de la droite de la figure 2.19 est reliée au nombre de doublets en solution pour une quantité d'antigènes donnée ([21]). Cette quantité de doublets peut être influencée par le nombre d'anticorps présent dans le milieu réactionnel. En dessous d'une certaine concentration en anticorps, la formation de complexe n'est pas totale, il s'agit de la barrière thermodynamique. En théorie, cette concentration doit être 100 fois supérieure à la constante de dissociation du couple. Dans notre cas, la constante

de dissociation vaut 0,01 pM (couple modèle streptavidine-biotine), la concentration minimale d'anticorps est alors de l'ordre de la picomole. Nous allons vérifier le franchissement de cette limitation thermodynamique en changeant le nombre d'anticorps par bille, ce qui revient à changer la concentration en anticorps pour une concentration fixe de billes.

Influence du nombre d'anticorps par bille

Le protocole et la formulation établis par M. de Geus et décrits au paragraphe 2.2.3 dans la section dosage sont inchangés. Le système étudié est le système modèle streptavidine/biotine. Une douzaine de biotines sont greffées sur de la BSA afin de faciliter la reconnaissance spécifique, tout comme le système expérimenté par L. Cohen-Tannoudji. Le nombre de streptavidines actives par bille est évalué à l'aide d'un dosage indirect de biotine FITC. Ce nombre varie entre 2 et 100 (figure 3.7).

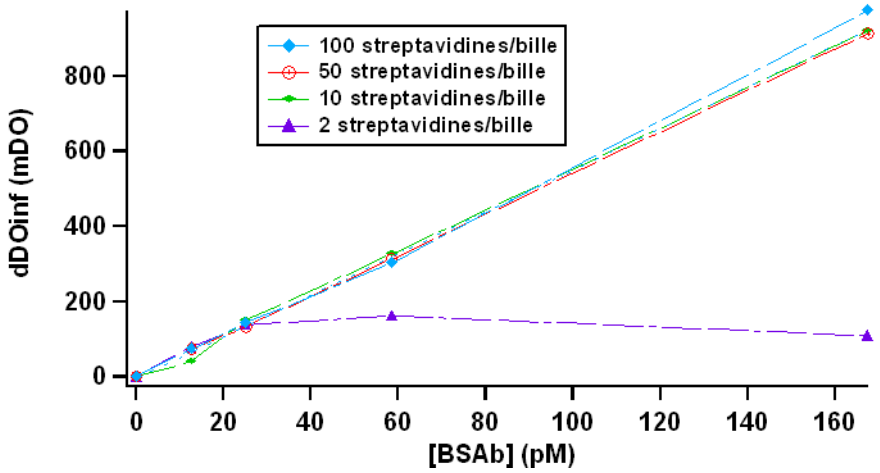


Figure 3.7 – Evolution de la variation de densité optique à l'infinie (valeur extrapolée à partir de la DO expérimentale) en fonction de la concentration en BSAb pour quatre taux de greffage différents 2, 10, 50 et 100 streptavidines à la concentration de 70 pM . greffées par Ademtech avec des streptavidines après un champ de 30 mT pendant 10 min. Le milieu d'analyse est du tampon phosphate à 100 mM, pH= 6,7 avec 0,4 % de F-127. Expérience réalisée par M. de Geus.

Le protocole de greffage établi au laboratoire permet de fonctionnaliser une

faible quantité de billes. Les mesures correspondant à un taux de greffage sont réalisées avec des billes issues du même greffage afin de s'affranchir de la variabilité du nombre d'anticorps par bille entre les greffages. Aux très faibles taux de greffage, cette caractéristique est primordiale pour l'interprétation des résultats. L'inconvénient de cette méthode est le faible nombre de billes greffées. Les mesures sur chacun des lots correspondant à un taux de greffage spécifique ont donc été réalisées une seule fois.

Les résultats présentés figure 3.7, révèlent un taux d'adhésion non spécifique identique pour chacun des lots (autour de -38 mDO). Les taux de greffage étant très faibles - pour 100 streptavidines par bille, les streptavidines occupent moins de 2 % de la surface disponible - les billes ne sont pas d'avantage déstabilisées par l'addition de quelques anticorps. Cela met l'accent plutôt sur un problème de greffage. La principale cause de ce bruit, huit fois plus élevée qu'avec des billes non greffées, proviendrait des "traitements chimiques" subis au cours du greffage.

Les pentes initiales des courbes de dosage (0.5) sont identiques quel que soit le nombre de streptavidines par bille. Deux phénomènes expliquent ces résultats :

- l'efficacité de la rotation brownienne des billes sous champ. Le temps attendu sous champ est suffisamment long pour que la vitesse de reconnaissance sous champ soit indépendante du nombre de récepteurs par bille.
- l'aspect thermodynamique non limitant. La concentration d'anticorps est toujours en large excès par rapport à la constante de dissociation du couple BSAb/streptavidine ($[Anticorps] \gg K_D$), favorisant ainsi la consommation quasi totale de l'antigène (loi de masse).

Cette dernière remarque peut s'avérer fausse sur des systèmes ayant une constante de dissociation plus élevée que celle du couple modèle BSAb/streptavidine.

Ainsi, la sensibilité du test est indépendante du nombre d'anticorps par bille pour les faibles taux de greffage (ceux testés) car le bruit et les pentes des droites sont inchangées. En revanche, ce taux de greffage semble conditionner la valeur de saturation (visible pour 2 streptavidines par bille) qui est relié à la saturation des sites actifs présents sur la bille.

D'après le paragraphe précédent, la quantité de bille a une influence sur le bruit

de la mesure. Nous allons maintenant regarder son influence sur le signal car la sensibilité de notre test dépend du ratio signal/bruit.

Influence du nombre de billes

Comme nous l'avons précédemment écrit, le signal, relié au nombre de doublets en solution, est fixe pour une concentration en antigène donnée car nous sommes dans le cas où le nombre d'antigènes est très inférieur à celui des billes. Il est a priori indépendant du nombre de billes. Cette hypothèse va être vérifiée en variant les concentrations en bille entre 25 et 380 pM en présence de différentes concentrations en agents (figure 3.8).

Cette étude a été réalisée à partir du kit contrôle positif du KIM. Toutes les billes ont le même taux de greffage.

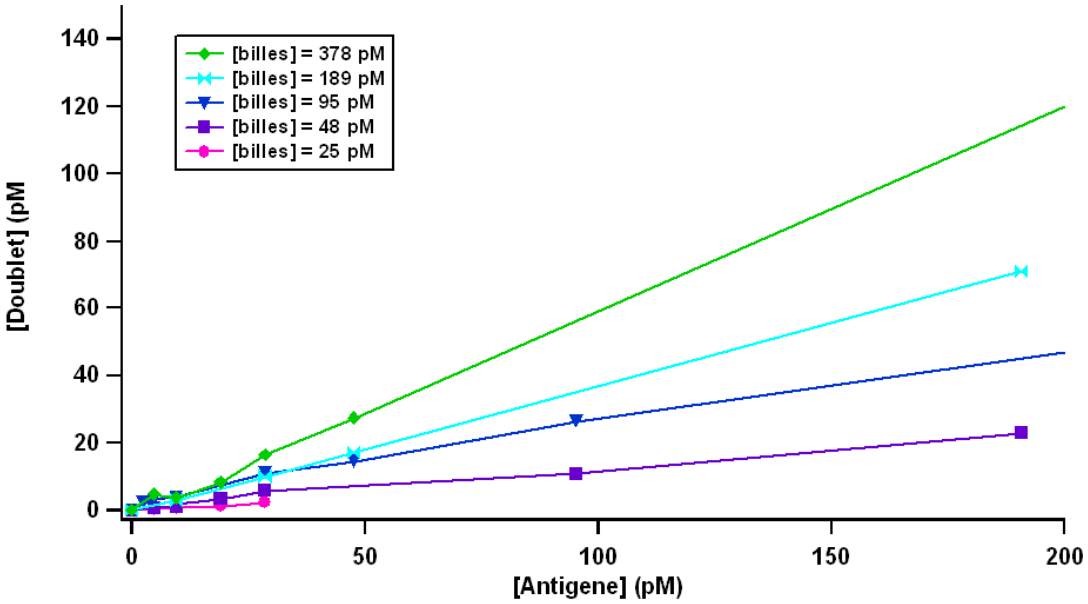


Figure 3.8 – Evolution de la concentration de doublets en milieu tamponné (formulation non renseignée) en fonction de la concentration en antigènes pour cinq concentrations de billes 25, 48, 95, 189 et 389 pM après un champ de 30 mT pendant 10 min. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

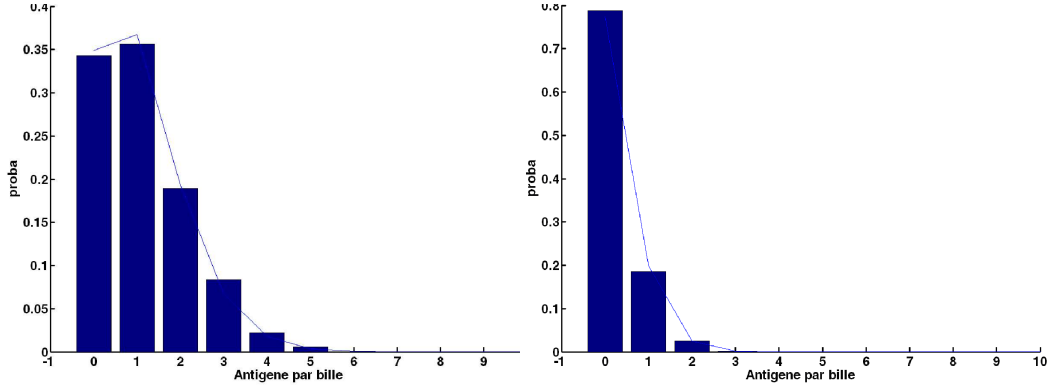
La concentration en antigènes a été variée de 0 à 1000 pM. Seuls les points

obtenus entre 0 et 200 pM d'antigènes sont représentés. Les courbes présentées figure 3.8 ne sont pas normées afin de constater l'influence du nombre de billes sur le taux d'agglutination non spécifique (mesure faite sans antigène). En normant ces courbes, on remarque que les pentes sont identiques aux faibles concentrations en antigène (inférieure à 25 pM). Ensuite plus le nombre de billes est important, plus le signal est intense. Pour une même concentration en antigène, on forme plus de doublets lorsque le nombre de billes en solution est important. Ceci est à mettre en relation avec la géométrie du test. La distribution de l'antigène sur les billes est différente suivant le nombre de billes à concentration en antigène fixe. Cette répartition semble suivre une distribution de Poisson de valeur moyenne λ

$$f(k,\lambda) = \frac{\lambda^k . e^{-k}}{k!} \tag{3.1}$$

où

$$\lambda = \frac{C_{BSA}}{C_{billes}}$$



(a) $N_{antigene/bille} = 1,05$, environ 30 % des billes n'ont pas d'antigène **(b)** $N_{antigene/bille} = 0,26$, la répartition est quasi unitaire

FIGURE 3.9 – Répartition théorique de 100 pM d'antigènes pour 2 concentrations de billes (a) 95 pM et (b) 389 pM à partir de la loi de poisson

Si on simule la répartition de 100 pM d'antigènes pour deux concentrations de billes 95 et 389 pM (figure 3.9), on remarque que plus le nombre de billes est

faible, plus la probabilité de trouver plusieurs antigènes par bille est grande. La répartition est de plus en plus large et décalée vers la droite. Dans notre test, un doublet révèle la présence d'un antigène. Afin d'être plus sensible, la probabilité de trouver plusieurs antigènes par bille doit être minime. Ceci encourage la présence d'un nombre élevé de billes, au moins trois fois la quantité d'antigènes.

La figure 3.10 simule la concentration de doublets en fonction de la concentration en antigènes pour les cinq concentrations de billes testées expérimentalement suivant l'équation 3.2. La concentration de doublets est égale à la concentration de billes initiale moins celles n'ayant pas d'antigène à leur surface (distribution de Poisson de paramètre 0).

$$C_{doublet} = C_{bille}(1 - f(0, \frac{C_{BSA}}{C_{bille}})) \tag{3.2}$$

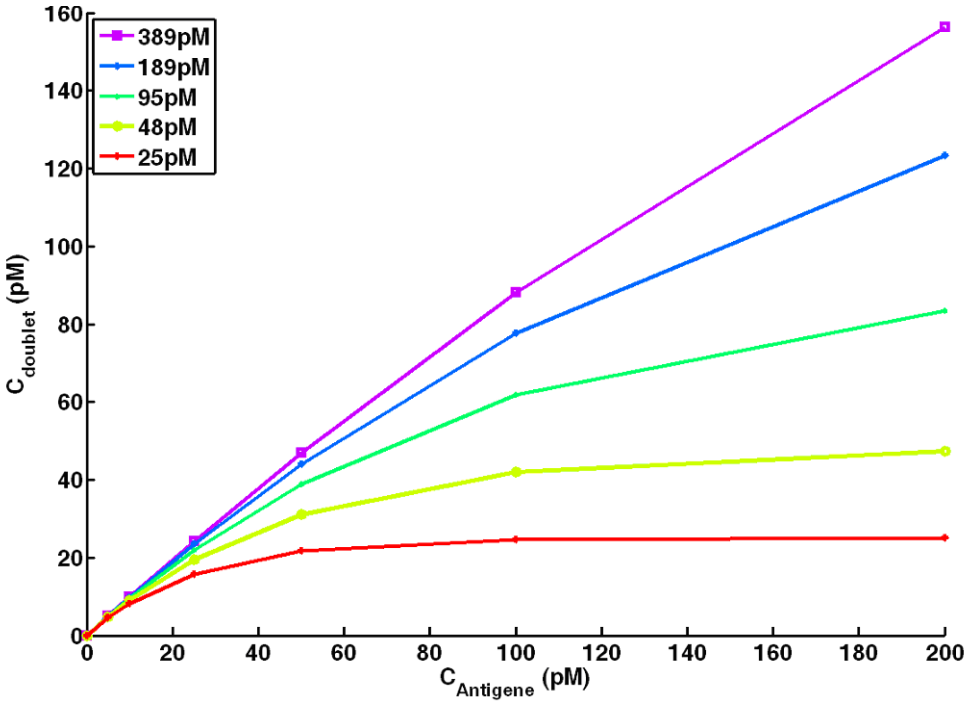


Figure 3.10 – Simulation de la concentration de doublets en fonction de la quantité d'antigène pour cinq concentrations de billes 25, 48, 95, 189 et 378 pM à partir de la loi de poisson.

Les résultats de la simulation sont quasiment superposables à ceux de l'expérience (figure 3.8). Seul le nombre de doublets formé diffère. Il est plus élevé avec la simulation car cette méthode de calcul ne prend pas en compte l'indice de réfraction des billes utilisés pour déterminer le nombre de doublets obtenus expérimentalement.

Un deuxième phénomène peut également intervenir, il s'agit de la thermodynamique relié au nombre total d'anticorps présents dans le milieu réactionnel. Aux concentrations testées, ce nombre influencerait la formation de complexe et donc la concentration de doublets. La concentration en anticorps étant proportionnelle à la concentration en billes, plus cette dernière est faible, plus la pente du dosage diminue. Dans notre cas, étant donné la faible valeur de la constante de dissociation du couple streptavidine-biotine ($K_D = 10^{-14}$M), ce phénomène n'est pas observé car nous sommes toujours dans le cas où la concentration en anticorps est au moins 100 fois supérieure à cette constante de dissociation.

Ainsi, une bonne sensibilité est un compromis entre un fort signal (pente importante) lié au nombre élevé de billes et d'anticorps et une faible valeur de bruit encouragée par un petit nombre de billes et d'anticorps. Le compromis est le maitre mot d'une bonne sensibilité. Une concentration en billes aux alentours de 100 pM est utilisée car elle permet de doser une large gamme de concentration en antigènes tout en minimisant le bruit.

Les conditions optimales au niveau de la répartition de l'antigène sur les billes correspondant au ratio antigène/ bille, sont établies, il reste à amplifier le signal issu d'un doublet. Pour cela, nous allons regarder l'influence de la taille des billes sur la variation de DO au cours d'un processus d'agrégation.

Influence de la taille des billes

La théorie

Dans nos expériences, les intensités diffusée et absorbée sont relativement importantes en raison de la taille des colloïdes et de leur indice de réfraction. De plus, ces objets ne sont pas soumis à la même intensité incidente suivant leur position dans l'échantillon (figure 3.11).

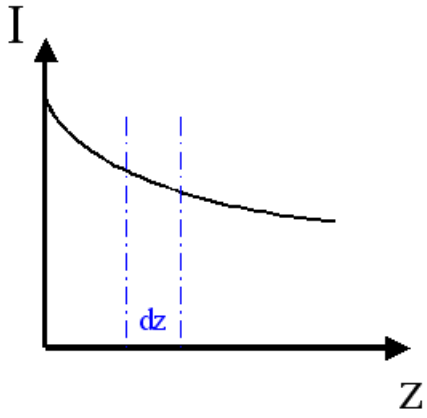


Figure 3.11 – Représentation de l'intensité incidente "vue" par les objets suivant leur position z dans l'échantillon - cas d'un échantillon concentré.

En turbidimétrie, sur un élément d'épaisseur infinitésimale dz, l'échantillon est homogène, l'intensité perdue par diffusion et absorption est :

$$dI = -I(z)(C_{DIFF} + C_{ABS})\rho dz \tag{3.3}$$

où I(z) est l'intensité reçue par l'échantillon en z, C_{DIFF} la section efficace de diffusion, C_{ABS} la section efficace d'absorption et ρ la densité d'objets diffusants.

L'intensité transmise à travers un échantillon de longueur l vaut ainsi :

$$I = I_0 e^{(C_{DIFF}+C_{ABS})\rho l} \tag{3.4}$$

Les valeurs des sections efficaces d'absorption et de diffusion dépendent de la taille des objets, de leur forme, de leur indice de réfraction et de la longueur d'onde. Ces valeurs sont simulées numériquement via un logiciel disponible sur internet pour des billes magnétiques dont l'indice de réfraction est approximé à $1,78 + 0,02 \cdot i$ [63]. La figure 3.12 reporte l'efficacité des billes notée Q, représentant la section efficace de diffusion ou d'absorption divisée par l'aire de la bille, en fonction du paramètre x tel que $x = 2\pi\frac{n}{\lambda}R_{bille}$ en échelle log-log pour faire apparaitre une relation de proportionnalité entre Q et x.

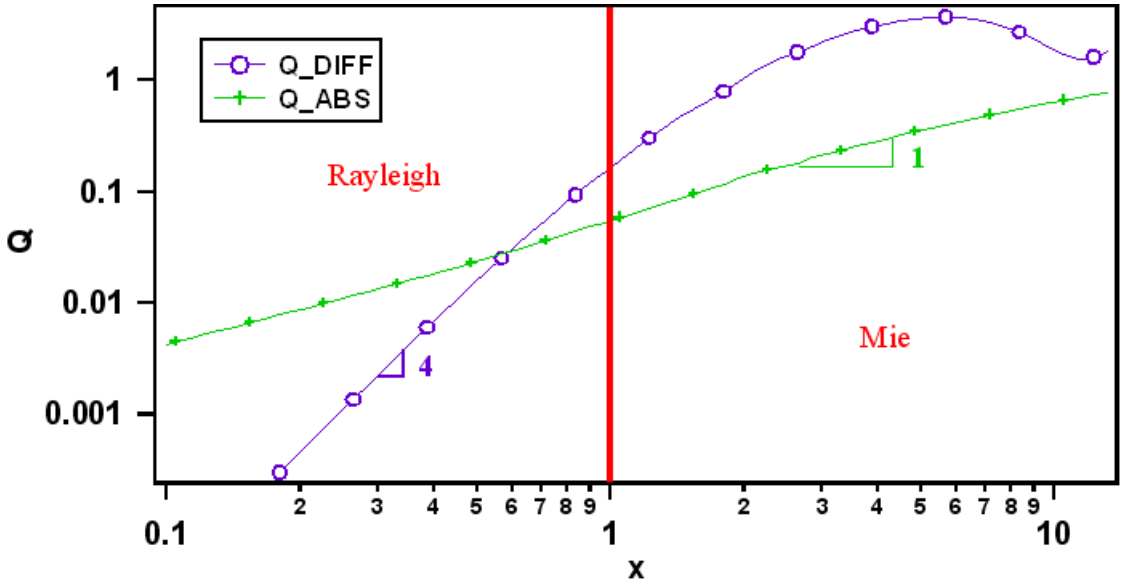


FIGURE 3.12 – Evolution de l'efficacité Q d'absorption (croix) et de diffusion (cercle) d'une bille en fonction de x, avec $Q = \frac{C}{\pi R_{bille}^2}$ en échelle log-log. Simulation numérique faite à partir du programme disponible sur internet [64].

A λ fixe, la lumière absorbée par les billes est proportionnelle au volume. En revanche, la lumière diffusée diffère suivant la taille.

Pour x $<$ 1, nous sommes dans le cas de l'approximation de Rayleigh correspondant au cas où les objets sont petits devant la longueur d'onde. L'intensité diffusée est proportionnelle au volume des billes au carré ($C_{DIFF} \propto \frac{V^2}{\lambda^4}$) car d'après la figure 3.12, $Q_{DIFF} \propto x^4$ soit $C_{DIFF}/R^2 \propto R^4$.

Pour x $>$ 1, la théorie de Mie s'applique. L'intensité diffusée par les billes n'est plus proportionnelle à leur volume au carré, elle varie plus faiblement.

De manière générale, plus les billes sont grandes, plus les intensités diffusée et absorbée sont importantes. L'intensité transmise est alors de plus en plus faible.

En turbidimétrie, on considère la densité optique DO, qui vaut par définition et d'après l'équation 3.4 :

$$DO = -log(\frac{I_T}{I_0}) = \frac{1}{2,3}(C_{DIFF} + C_{ABS})\rho l \tag{3.5}$$

Ainsi à l'instant initial, la solution est composée uniquement de singulet à la densité ρ_1. La densité optique initiale notée DO_0, vaut :

$$DO_0 = \frac{1}{2,3}(C^1_{DIFF} + C^1_{ABS})\rho_1 l \tag{3.6}$$

Puis, à l'instant t, des doublets ont été formés et sont présents en densité ρ_2. La densité de singulet est égale à la densité initiale de singulet, notée ρ_1, moins deux fois celle des doublets c'est-à-dire $\rho_1 - 2\rho_2$:

$$DO_t = \frac{1}{2,3}(C^1_{DIFF} + C^1_{ABS})(\rho_1 - 2\rho_2)l + \frac{1}{2,3}(C^2_{DIFF} + C^2_{ABS})\rho_2 l \tag{3.7}$$

Les grandeurs indicées par « 1 » sont relatives aux singulets et celles indicées par « 2 » aux doublets.

Dans le cas de l'approximation de Rayleigh, l'intensité diffusée étant proportionnelle au volume des billes au carré , un doublet diffuse quatre fois plus qu'un singulet soit $C^2_{DIFF} = 4C^1_{DIFF}$ et absorbe deux fois plus qu'un singulet $C^2_{ABS} = 2C^1_{DIFF}$. En remplaçant ces valeurs dans l'équation 3.7, on obtient :

$$DO_t = \frac{1}{2,3}(C^1_{DIFF} + C^1_{ABS})(\rho_1 - 2\rho_2)l + \frac{1}{2,3}(4C^1_{DIFF} + 2C^2_{ABS})\rho_2 l \tag{3.8}$$

soit

$$DO_t = \frac{1}{2,3}(C^1_{DIFF} + C^1_{ABS})\rho_1 l + \frac{1}{2,3}(2C^1_{DIFF})\rho_2 l \tag{3.9}$$

Le signal mesuré est une variation de DO entre l'état final et initial, ainsi

$$\Delta DO = \frac{1}{2,3}2C^1_{DIFF}\rho_2 l \tag{3.10}$$

Dans le cas de Rayleigh, le signal dépend de la section efficace de diffusion d'une bille du nombre de doublets en solution (ρ_2) et de la longueur de la cuve l. Deux paramètres expérimentaux permettent d'augmenter cette variation de signal pour une même concentration de doublets : la taille des billes ($\propto C_{DIFF}$) et la longueur

de la cuve. Ce dernier paramètre est peu intéressant car il augmente la quantité de réactifs et donc le coût d'un test. Précédemment nous avons vu que la section efficace de diffusion variait avec le volume au carré des billes, ainsi de grandes billes permettraient d'amplifier le signal. Mais à partir d'une certaine valeur, cette augmentation de taille entraine un changement de régime.

Le test développé au laboratoire utilise des billes de 200 nm de diamètre et une longueur d'onde de 632 nm ; le paramètre x vaut alors 1,44. Nous sommes dans le régime de Mie, les intensités absorbée et diffusée par un doublet se calculent à partir de l'algorithme de Mackovski [64]. L'intensité absorbée est toujours proportionnelle au volume des billes soit $C^2_{ABS} = 2C^1_{DIFF}$. En revanche, la différence d'intensité diffusée par un doublet et un singulet dépend grandement du ratio des sections efficaces d'un doublet et d'un singulet. On pose $\alpha = \dfrac{C^2_{DIFF}}{C^1_{DIFF}}$ afin de simplifier l'équation 3.7 :

$$DO_t = \frac{1}{2,3}(C^1_{DIFF} + C^1_{ABS})\rho_1 l + \frac{1}{2,3}(\alpha - 2)C^1_{DIFF}\rho_2 l \tag{3.11}$$

La variation de DO vaut :

$$\Delta DO = \frac{1}{2,3}(\alpha - 2)C^1_{DIFF}\rho_2 l \tag{3.12}$$

Dans le régime de Mie, la variable α s'ajoute à la liste des paramètres ajustables précédemment citée pour amplifier la variation de signal. L'évolution de ce paramètre en fonction de la taille des objets pour une longueur d'onde fixe (celle du laser) est représentée figure 3.13.

Nous rappelons que plus la valeur de α est grande, plus le signal issu des doublets est important. Pour observer une variation de signal, il faut absolument que $\alpha \neq 2$. Plus α s'écarte de cette valeur, plus la variation de signal est importante. Pour de petits objets (1 nm $<$ R $<$ 200 nm), la variation de DO est positive. Pour des billes ayant un rayon inférieur à 20 nm, elle est maximale (α =4, cas de Rayleigh), puis chute sévèrement. Au delà d'un rayon de 200 nm, la variation de DO est négative et faible ($\alpha \sim 1,5$). Ceci permet d'expliquer la chute de DO lors du phénomène d'agrégation latérale (paragraphe 3.1).

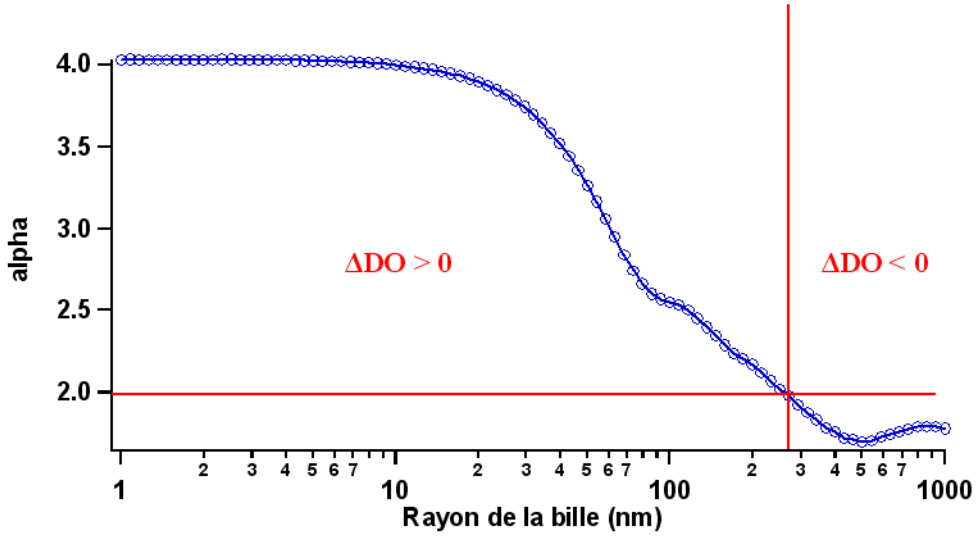


Figure 3.13 – Evolution du paramètre alpha où alpha=$\frac{C^2_{DIFF}}{C^1_{DIFF}}$ en fonction du rayon de la bille, à 632 nm. Simulation numérique faite à partir du programme disponible sur internet [64].

Le graphique, représenté figure 3.13, nous renseigne sur l'écart existant entre l'intensité diffusée par un singulet et par un doublet. Des billes très petites, rayon inférieur à 30 nm, semblent améliorer la détection. Un deuxième facteur est également à considérer celui de la quantité de lumière émise par ces billes (C_{DIFF}). Plus les billes sont grosses, plus la lumière est amplifiée. Nous allons ajouter ce paramètre, la section efficace de diffusion, à la simulation précédente pour obtenir la variation de DO engendrée par la présence d'une picomole de doublets en fonction de la taille des objets (figure 3.14).

La variation de DO étant directement proportionnelle à la concentration d'antigènes, nous remarquons qu'en prenant des billes de 400 nm de diamètre, le signal peut être amplifié une dizaine de fois par rapport au format habituel (billes de 200 nm de diamètre). Le signal turbidimétrique est favorisé par une grande section efficace de diffusion et moins par un grand écart entre les sections efficaces doublet/singulet.

Reste à considérer, l'effet de la taille des billes sur la sensibilité. La sensibilité

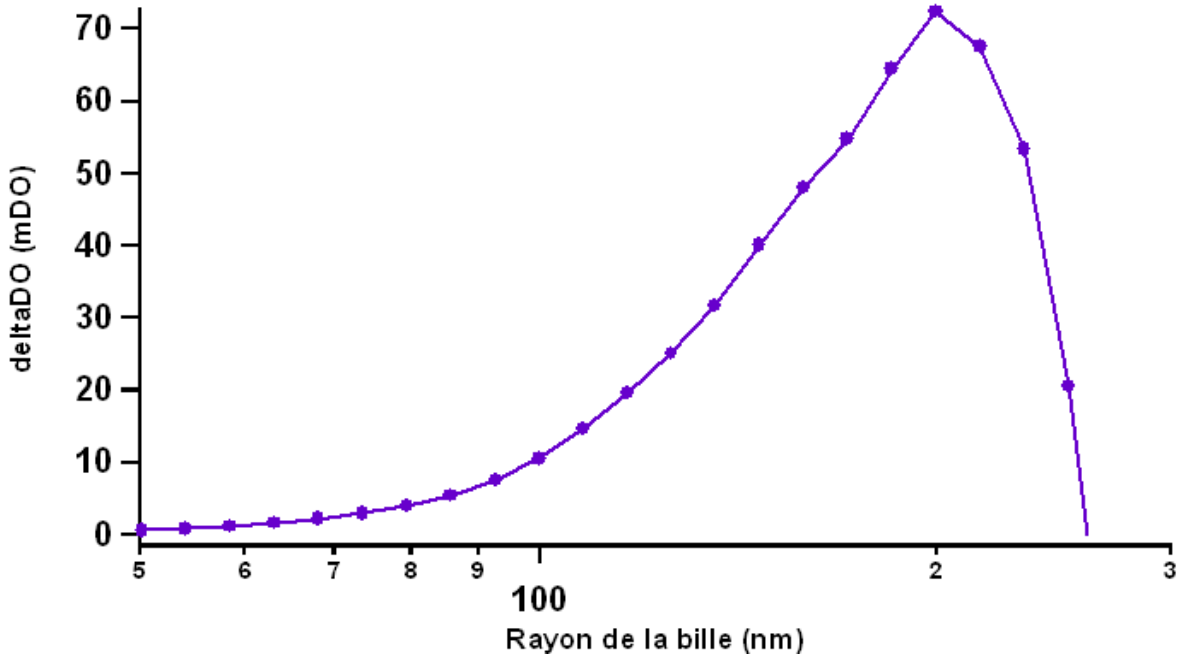


FIGURE 3.14 – Evolution de la variation de densité optique pour 1 picomole de doublets en fonction du rayon des billes. La mesure de densité optique est effectuée à 632 nm.

est définie à partir du rapport signal/bruit qui s'écrit :

$$\frac{\Delta DO}{DO_0} \approx \frac{\frac{1}{2,3}(\alpha-2)C^1_{DIFF}\rho_2 l}{\frac{1}{2,3}C^1_{DIFF}\rho_1 l} = (\alpha-2)\frac{\rho_2}{\rho_1} \tag{3.13}$$

Une grande sensibilité est encouragée par une faible valeur de ρ_1 et une grande valeur de ρ_2 et de α. Ce résultat confirme l'intérêt de travailler avec des grandes billes car elles permettent de diminuer la quantité initiale de colloïdes (ρ_1) tout en conservant un bon signal et l'assurance de franchir la barrière thermodynamique. En effet, si on veut détecter la femtomole avec des billes de 200 nm de diamètre, la sensibilité de la turbidimétrie, fixée par sa reproductibilité qui est au mieux de l'ordre de 0,1 %, nous impose de travailler au maximum avec mille fois plus de billes, soit une concentration de l'ordre de la picomole. Le nombre d'anticorps par bille étant d'une centaine (pour des raisons de stabilité colloïdale), la concentration d'anticorps dans le milieu est alors voisine de 100 pM. Or, la plupart des

couples antigènes-anticorps a une constante de dissociation également proche de 100 pM. Ainsi, l'équilibre est très faiblement déplacé vers la formation de complexe. L'utilisation de grande bille permet d'augmenter le nombre d'anticorps par bille c'est-à-dire la concentration d'anticorps dans le milieu d'analyse pour un même nombre de bille.

Tous ces résultats sont issus de simulations numériques, seuls les résultats expérimentaux vont nous permettre de conclure sur le réel gain d'une augmentation de la taille des billes sur le signal turbidimétrique.

L'expérience

Des billes de 150 nm de diamètre ont été testées. D'après figure 3.14, elles engendrent une perte de signal de 3,6 par rapport au format habituel. Ces billes sont fournies par Ademtech et recouvertes de streptavidines. Afin d'obtenir un signal turbidimétrique mesurable, il faut une quantité de billes suffisamment grande pour bien répartir l'antigène sur les billes (au minimum 3 fois plus de bille) mais également suffisamment petite pour diminuer le bruit dû au nombre important de billes. Une quantité de billes dix fois supérieure à celle utilisée pour les billes de 200 nm est jugée optimale. Différentes concentrations de BSAb sont ajoutées à deux concentrations de billes (figure 3.15).

Pour ces essais, un seul point de mesure est réalisé car à ce stade nous avons considéré qu'il existe une relation de proportionnalité entre la valeur du bruit et sa reproductibilité. Il n'a pas été jugé nécessaire d'évaluer l'écart-type pour tous les points. Sur le kit de contrôle positif du KIM, l'écart-type représentait 15 % de la mesure du bruit.

Le bruit de la mesure (130 mDO et 180 mDO) et par suite son écart-type sont importants pour les deux concentrations de billes en raison du nombre élevé de billes et de l'important taux de greffage des billes (proche de la monocouche). Cette valeur peut être diminuée au maximum d'un facteur deux, en diminuant le nombre de streptavidines par bille. La pente des droites est identique (aux erreurs de manipulation près) et vaut 0,8. Cette valeur est faible ; elle est 5 fois plus faible que celle obtenue avec les billes de 200 nm de diamètre (cf figure 3.1). Elle est principalement due à la faible section efficace de diffusion (2,5 fois plus petite).

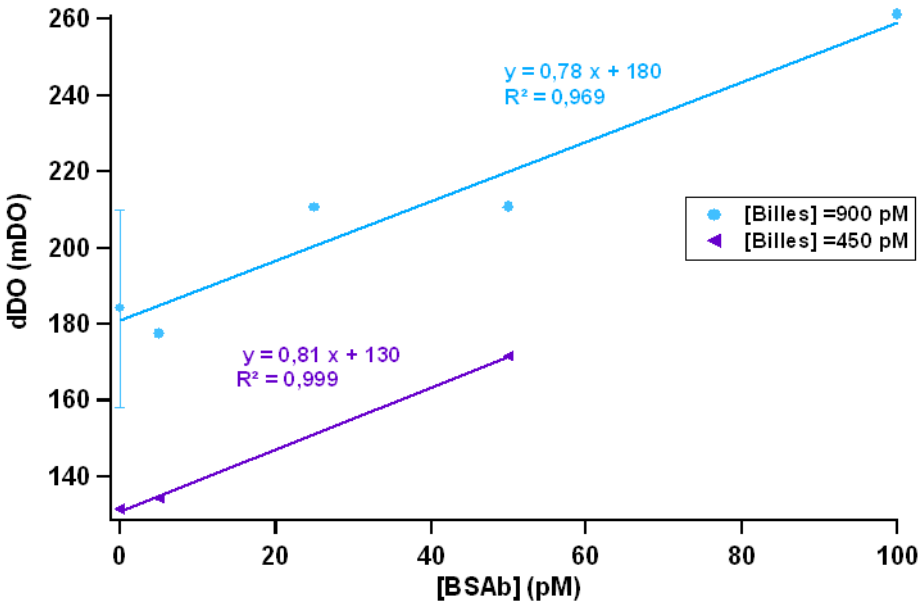


FIGURE 3.15 – Evolution de la variation de densité optique en fonction de la concentration en BSAb pour deux concentrations de billes 450 et 900 pM, greffées par Ademtech avec des streptavidines après un champ de 30 mT pendant 10 min. Le milieu d'analyse est du tampon phosphate à 100 mM, pH= 6,7 avec 0,4 % de F-127. La mesure de densité optique est effectuée à 632 nm et $R_{bille} = 75nm$. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

L'expérience valide ainsi la théorie. L'intensité diffusée par les doublets n'est que faiblement amplifiée. De plus, le nombre élevé de billes dans le milieu réactionnel diminue la sensibilité de la détection. Le seul avantage de ces billes résident dans l'extension de la gamme de mesure de la concentration en antigènes grâce au nombre très élevé de billes.

La taille de bille optimale (400 nm de diamètre), correspondant au signal le plus fort donnée par la théorie, n'existe pas dans le commerce. Nous avons donc utilisé des particules magnétiques de 500 nm de diamètre fournies par Ademtech (MasterBeads Streptavidin 0315). Ces particules sont recouvertes de streptavidines (valeur proche de la monocouche). Aucune variation significative de signal est enregistrée en présence de BSAb car la lumière diffusée par un doublet se rapproche de celle de deux singulets. Leur distinction n'est plus possible en observant la

lumière transmise.

Les grands objets ayant une diffusion anisotrope, nous simulons le profil de diffusion d'un singulet et d'un doublet (figure 3.16) à l'aide de l'algorithme de Mackovski pour trouver un meilleur angle de détection. A 70° et 145°, la différence d'intensité entre un singulet et un doublet est maximal. Ces deux angles correspondent aux minima de l'intensité diffusée par une bille.

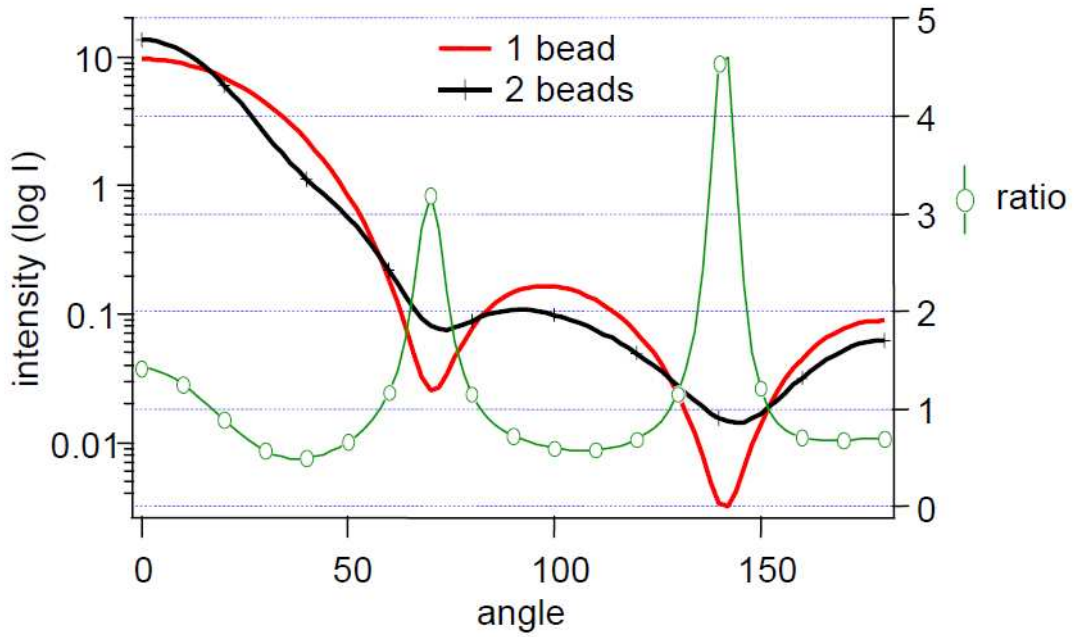


Figure 3.16 – Représentation du logarithme de l'intensité diffusée par des billes de 500 nm de diamètre en fonction de l'angle d'observation à 633 nm. En rouge, pour une bille et en noir pour deux billes (modèle pour les doublets).

Le profil de diffusion des billes est alors établi expérimentalement à l'aide d'un goniomètre (figure 3.18). Cet appareil est un spectromètre multi-angle (figure 3.17).

Il recueille l'intensité diffusée par une suspension colloïdale sur une plage angulaire comprise entre 15° et 150°.

L'intensité diffusée par nos billes décroit brutalement avec l'angle d'observation. Aucun minimum n'est présent, ceci est à mettre en relation avec la forte polydis-



Figure 3.17 – Photo du goniomètre utilisé, le CGS-3 (Compact Goniometer System) de Malvern Instruments.

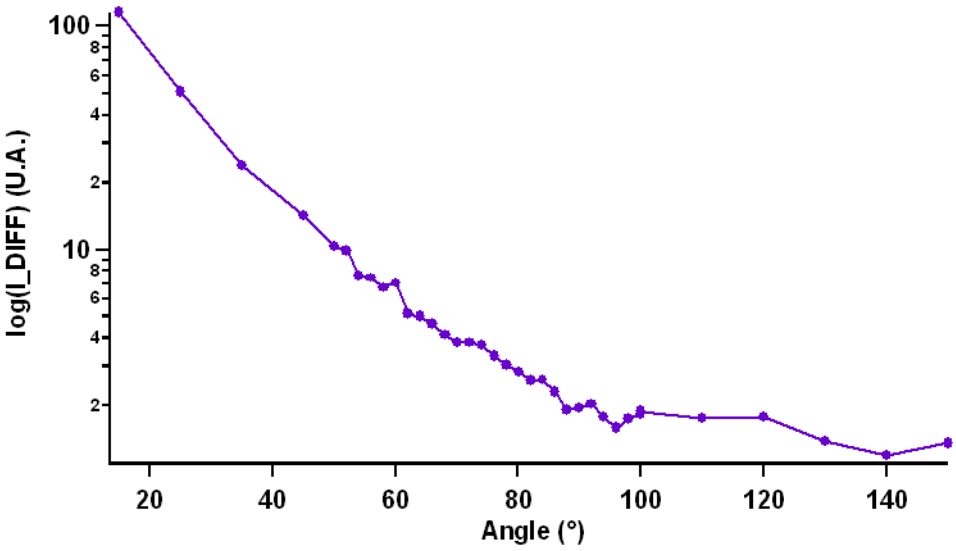


Figure 3.18 – Représentation du logarithme de l'intensité diffusée à 633 nm par une suspension de billes magnétique de 500 nm de diamètre à 10^{-4}% en masse en fonction de l'angle d'observation.

persité des billes ($\sim$ 14%) mesurée par diffusion de la lumière. La détection de doublets est donc impossible.

Nous décidons de persévérer en utilisant des billes très monodisperses car une grande taille de billes est le seul moyen pour augmenter le signal émis par un doublet. Afin de s'affranchir des problèmes de réactivité et de s'assurer de la réelle présence de doublets en solution, nous utilisons des singulets et des doublets de billes de silice. Les singulets sont monodisperses (1,21 μm $\pm$ 0,08) et les doublets sont permanents car les deux billes de silice sont liées chimiquement (figure 3.19).

Ces objets ont été fonctionnalisés et triés par un ancien doctorant du laboratoire

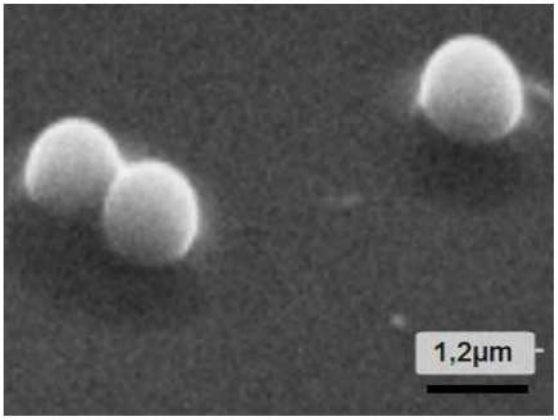


Figure 3.19 – Image faite au microscope à balayage électronique d'un singulet et d'un doublet de billes de silice de 1,2 μm de diamètre [65].

D. Zerrouki [65]. Deux solutions sont analysées et présentées figure 3.20 et 3.21. Une solution contenant uniquement des singulets, notée solution S et une solution contenant 40 % de doublets, solution D. L'intensité diffusée par les billes de silice

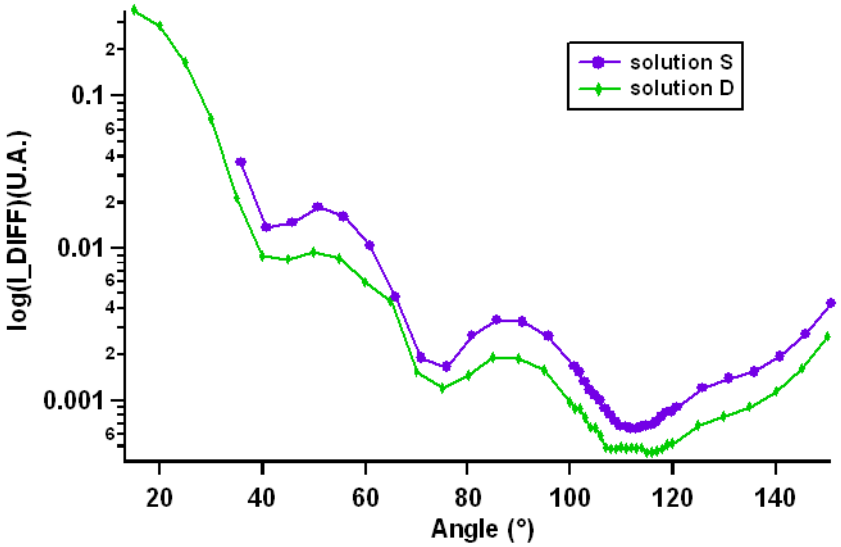


Figure 3.20 – Représentation du logarithme de l'intensité diffusée à 633 nm par les solutions S (en violet) et D (en vert) en fonction de l'angle d'observation.

est nettement plus faible que celle des billes magnétiques en raison de leur petit indice de réfraction (1,45). Trois minima apparaissent nettement à 40°, 75° et 110°. La différence d'intensité existant entre les solutions S et D provient du réglage fait automatiquement par l'appareil lors de l'analyse. Les courbes d'intensité sont superposées afin d'évaluer l'influence des doublets sur le profil de diffusion (figure 3.21).

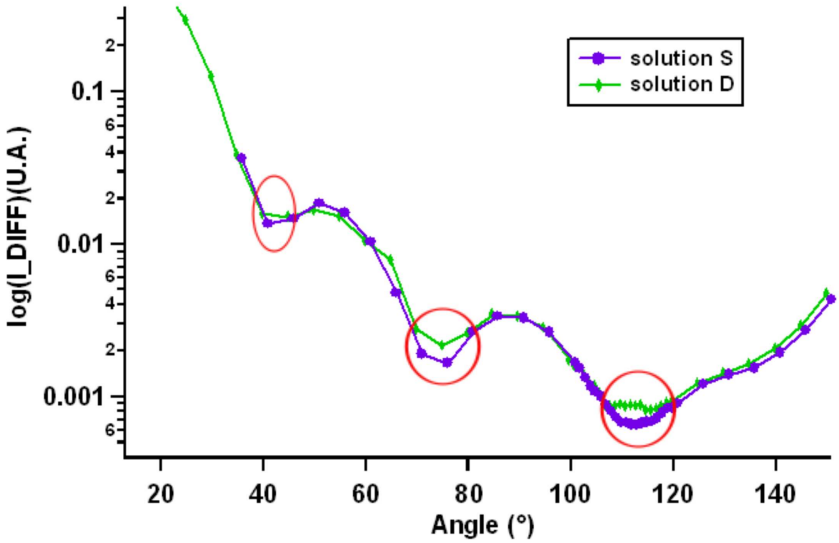


Figure 3.21 – Superposition du logarithme de l'intensité diffusée à 633 nm par les solutions S (en violet) et D (en vert) en fonction de l'angle d'observation.

Aux minima, l'intensité diffusée par la solution D est plus élevée que celle par la solution S. Le ratio entre ces deux intensités vaut 1,3. La quantification de doublets par cette méthode est compliquée car elle dépend beaucoup de la monodispersité des billes et le signal reste assez faible.

3.1.3 Conclusion

Le signal turbidimétrique est amplifié pour de grandes billes mais malheureusement cet effet se couple avec une distinction de plus en plus faible des doublets parmi les singulets. Une lecture individuelle basée sur la lumière diffusée par chaque

objet permettrait de s'affranchir de ces effets macroscopiques. La suite de ce chapitre porte sur la mise en place d'un nouveau mode de détection individuelle : la cytométrie avec des billes magnétiques de 1 μm de diamètre. Ces billes constituent un nouveau format pour le test d'agglutination magnétique. Leur efficacité biologique doit être testée.

3.2 De la mesure moyenne au comptage individuel

Le cytomètre en flux se définit comme la mesure (*-métrie*) des propriétés optiques de cellules (*-cyto*) transportées par un liquide vecteur (*flux*) jusqu'à une source d'excitation lumineuse. Cet appareil est très utilisé en biologie cellulaire. Il est né du besoin d'automatiser le comptage des constituants cellulaires du sang. Ses origines sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan conçut le premier appareil avec lequel il réalisa des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique [66]. Dans les années 70, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford ont associé des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires.

Son principe de fonctionnement est simple. Il consiste à faire passer individuellement les objets devant un laser via une focalisation hydrodynamique par un liquide vecteur appelé liquide de gaine de débit, au moins 10 fois supérieur à celui de l'échantillon (figure 3.22) et à recueillir simultanément les intensités diffusées aux petits angles entre 1° et 8° et aux grands angles à 90° (figure 3.23) [67]. Les signaux recueillis à ces angles s'appellent respectivement FSC (Forward Scattering) et SSC (Side Scattering). En FSC, un dispositif appelé beamstop masque les rayons transmis (à 0°). Cette méthode s'avère ainsi très prometteuse car elle permet de coupler deux signaux et de s'affranchir d'une lecture en volume où le signal est moyenné sur l'ensemble des billes. Des mesures de fluorescence peuvent également être effectuées.

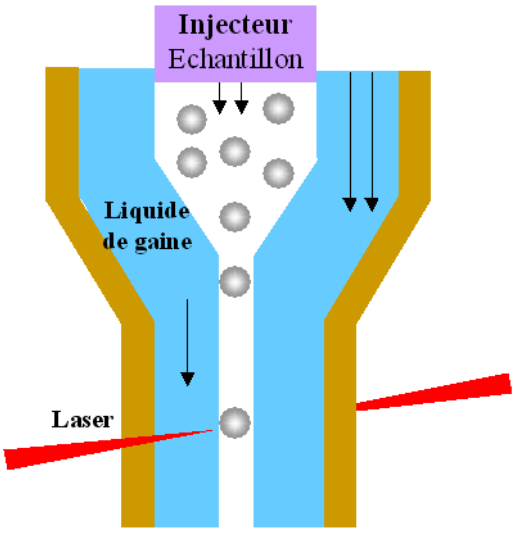


FIGURE 3.22 – Principe de la focalisation hydrodynamique dans un cytomètre à flux.

Dans notre cas, cet appareil va nous permettre d'analyser les intensités diffusées par des billes à deux angles (1°- 8° et 90°) et de manière individuelle. La fréquence de détection des objets est très rapide de 1 à 1000 évènements par seconde. Etant donné la maturité et les performances enregistrées en biologie par cette technologie - comptage et tri de bactéries, de cellules (taille comprise entre 1 et 10 μm) - la détection de doublets ne semble pas limitante. Nous décidons de travailler directement avec de "grosses" billes magnétiques monodisperses de 1 μm de diamètre, les billes Dynabeads MyOne Streptavidin produites par Dynal-Invitrogen.

Grâce à leur indice de réfraction élevé, les billes magnétiques se prêtent totalement à une détection cytométrique. Un "bon" signal cytométrique correspond à des pics fins (population monodisperse) et centrés dans la fenêtre d'observation. Par un jeu d'amplification des photomultiplicateurs, ces pics sont positionnés légèrement vers la gauche de l'étendue des mesures (ou fenêtre d'observation) afin de détecter les doublets. Le signal enregistré aux petits angles (en FSC) pour l'échantillon témoin est représenté figure 3.24.

Deux populations monodisperses apparaissent. L'une est centrée vers 6 (échelle arbitraire) et la deuxième population vers 15, ce qui est le double de l'intensité moyenne du premier pic. Ainsi, à gauche, nous visualisons les singulets et à droite

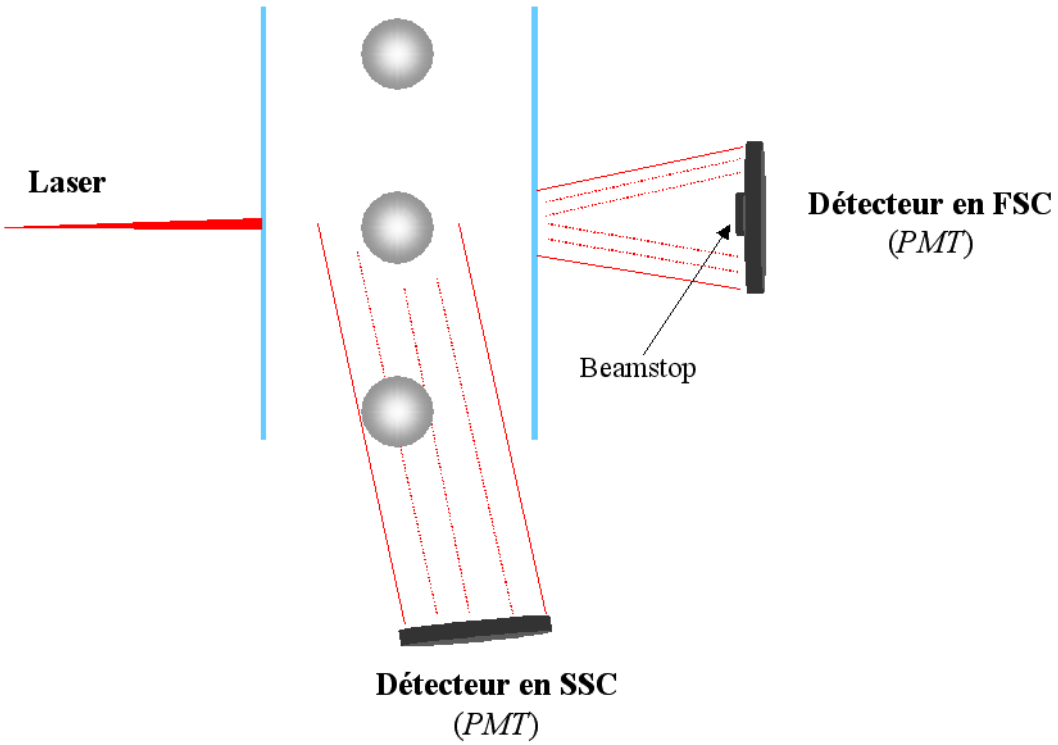


Figure 3.23 – Schématisation de la détection optique.

les doublets. Le signal obtenu à 90° (en SSC) est présenté figure 3.25.

L'intensité des pics est plus faible en SSC qu'en FSC. En SSC, nous sommes sensibles à la structure des objets et en FSC à leur taille. Le gain du PMT est augmenté pour centrer le signal. Deux pics apparaissent également à 21 et 40 correspondant respectivement aux singulets et aux doublets. Les signaux recueillis en FSC et SSC sont maintenant croisés afin de faire apparaitre plus clairement toutes les populations présentes dans l'échantillon (figure 3.26). Dans la suite du document, nous utiliserons le terme de résolution cytométrique.

Le croisement des informations obtenues simultanément à deux angles différents augmentent grandement la résolution. Il permet d'accéder à toutes les populations présentes en solution. Sur le cytogramme, une troisième population se distingue avec $I_{FSC} = 35$ et $I_{SSC} = 70$, il s'agit de triplets. De manière générale, le signal en FSC est plus monodisperse qu'en SSC car il est moins sensible à la polydisper-

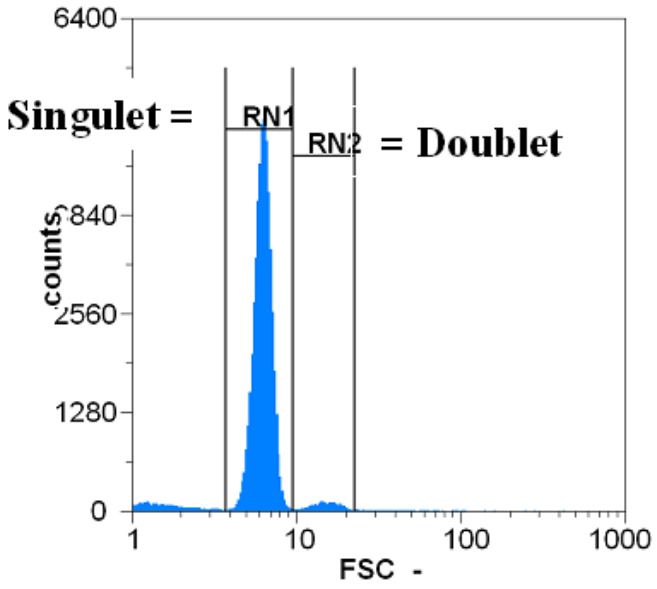


Figure 3.24 – Signaux obtenus en FSC (1°-8°) pour une solution de billes de 1 μm greffées avec des streptavidines (Dynabeads MyOne Streptavidin)- solution témoin (sans BSAb)après application du champ magnétique. Histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction de l'intensité. La concentration de la solution de billes injectée est à $10^{-3} pM$, le débit est de 1 $\mu L/s$ soit $\sim$ 1000 objets/s et le temps d 'injection est de 1 min.

sité des objets. En revanche, l'intensité entre les différentes populations (doublets, triplets ...) est plus bruitée.

La détection de doublets est ainsi validée. Les billes magnétiques MyOne Streptavidin sont monodisperses, peuvent être détectées en cytométrie et présentent un taux initial d'agrégats (non spécifique) assez élevé de 10 %.

Reste maintenant à établir un nouveau protocole d'agglutination adapté à la taille de bille retenue dans les paragraphes précédents (1 μm de diamètre).

3.2.1 Protocole

Le système modèle streptavidine/biotine est utilisé pour mettre au point le protocole afin de s'affranchir au maximum des problèmes de réactivité. D'après les données du fournisseur Dynal, le nombre de streptavidines par bille est éva-

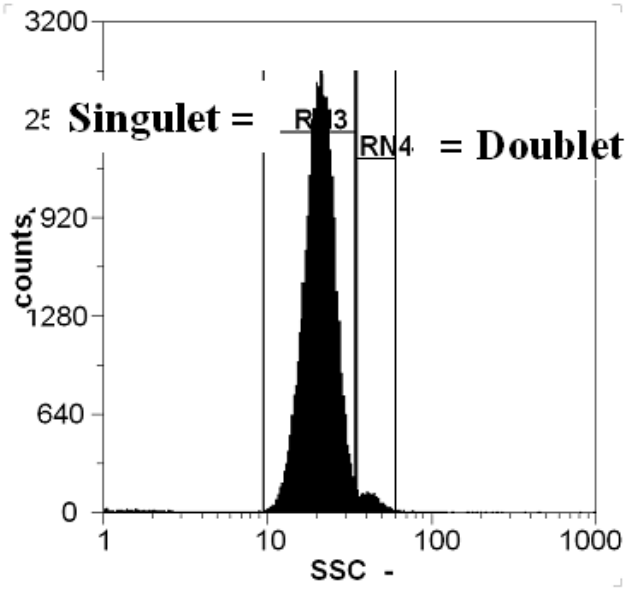


Figure 3.25 – Signaux obtenus en SSC (1°-8°) pour une solution de billes de 1 μm greffées avec des streptavidines (Dynabeads MyOne Streptavidin)- solution témoin (sans BSAb)après application du champ magnétique. Histogramme représentant le nombre d'évènements en fonction de l'intensité. La concentration de la solution de billes injectée est à $10^{-3} pM$, le débit est de 1 $\mu L/s$ soit $\sim$ 1000 objets/s et le temps d 'injection est de 1 min.

lué à une centaine de milliers. Ce taux élevé permet de travailler avec de faibles concentrations en billes tout en restant très supérieur à la constante de dissociation afin de favoriser la formation de complexe (contrainte thermodynamique). Une concentration en billes de 0,1 pM est choisie.

Par ailleurs, suivant les concentrations en BSAb, très supérieure à la concentration en bille, la taille des agrégats formés est très variable - présence de doublets, triplets, quadruplets... (figure 3.27 et 3.28).

Le protocole détaillé est donné en annexe 1.

Grâce à la cytométrie, nous pouvons comptabiliser chacune de ces populations, apportant ainsi une précision supplémentaire par rapport à la lecture turbidimétrique. Avec cette nouvelle méthode de détection, nous décidons de nous focaliser uniquement sur la population de singulet représentée par le pourcentage de sin-

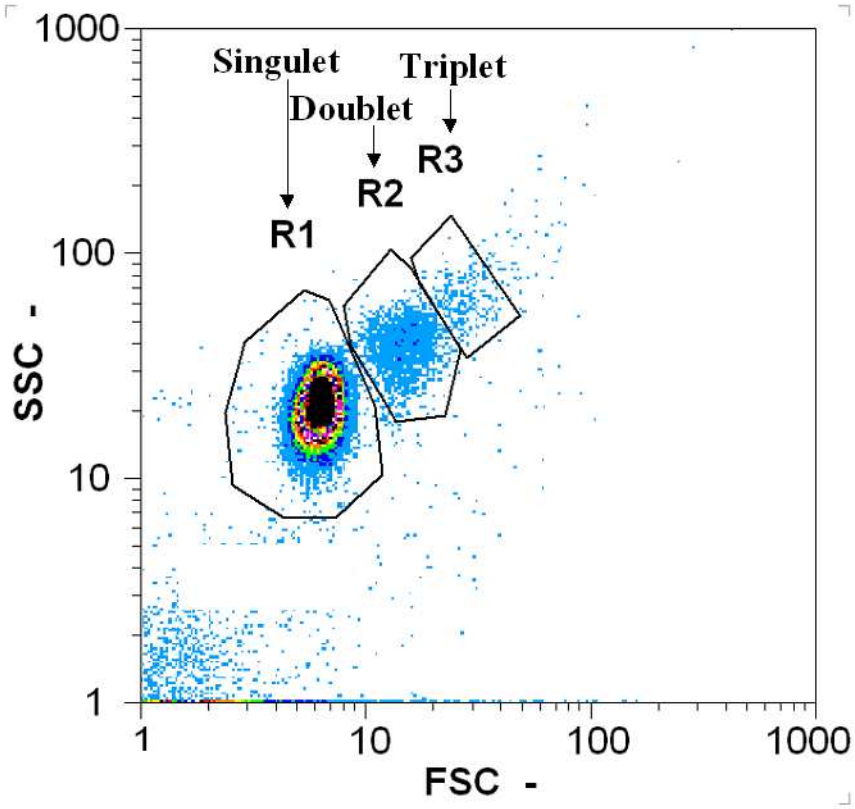


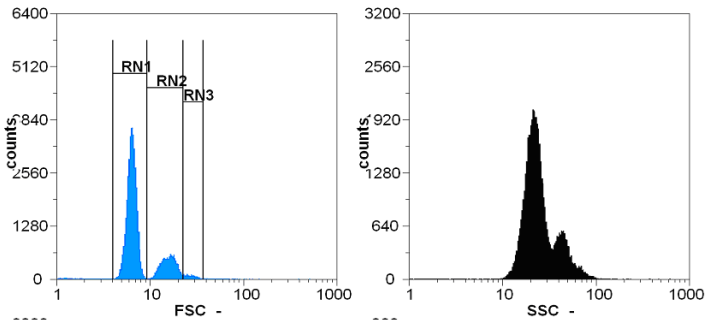
FIGURE 3.26 – Cytogramme représentant SSC en fonction FSC pour une solution de billes de 1 μm greffées avec des streptavidines (Dynabeads MyOne Streptavidin)- solution témoin (sans BSAb) après application du champ magnétique (B=50 mT pendant 30s et B=1 mT pendant 10 min). La concentration de la solution de billes injectée est à $10^{-3} pM$, le débit est de 1 $\mu L/s$ soit $\sim$ 1000 objets/s et le temps d 'injection est de 1 min.

gulets dans la population totale, notée $\%_{sing}$ et sa variation, seul dénominateur commun aux différentes solutions, calculée à partir de tous les agrégats comptabilisés.

$$\%_{sing} = \frac{R_1}{R_1 + 2R_2 + 3R_3 + 4R_4...} \tag{3.14}$$

avec R_1 = population de singulets, R_2 = population de doublets, R_3 = population de triplets ...

Ce nombre de singulets est ensuite retranché à la population totale afin de



(a) FSC **(b)** SSC

FIGURE 3.27 – Signaux recueillis pour une solution de billes MyOne Streptavidin à 0,1 pM en présence de 50 pM de BSAb après application du champ magnétique.

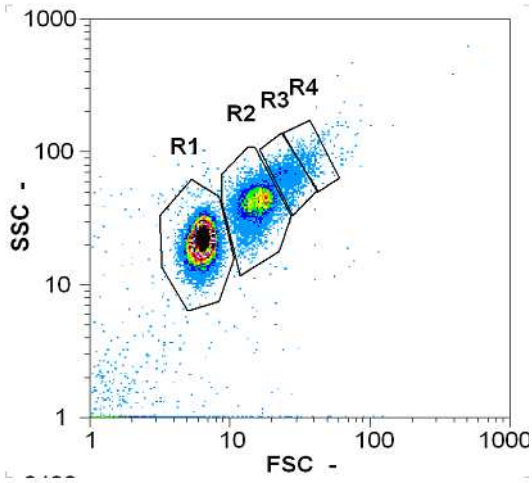


FIGURE 3.28 – Cytogramme représentant SSC en fonction FSC pour une solution de billes MyOne Streptavidin à 0,1 pM en présence de 50 pM de BSAb après application du champ magnétique (B=50 mT pendant 30s et B=1 mT pendant 10 min).

suivre le pourcentage de billes agrégées corrélé à la présence d'antigènes.

$$\%_{billesagregees} = 100 - \%_{sing} \tag{3.15}$$

Typiquement une solution de billes à 0,0001 % en masse soit 10 fM est injectée dans le cytomètre pendant 1 min avec un débit de 1. Le nombre de billes

comptabilisé est alors de 60000. Les paramètres physico-chimiques n'ont pas été étudiés car ils améliorent de quelques pourcents seulement le signal. Nous avons choisi de travailler dans du tampon phosphate à 100 mM à pH=6,7 au dessus du point isoélectrique de la streptavidine, estimé à 5 (Sigma Aldrich) avec 0,4 % de F-127. Ces conditions étaient celles utilisées par L. Cohen-Tannoudji avec les billes de 200 nm. Les billes et les solutions de BSAb se trouvent dans ce tampon. Des équivolumes des solutions de BSAb et de billes à 0,2 pM sont mélangés. Après une période d'incubation de 10 min à 37°C, un champ magnétique fort (50 mT) est appliqué pendant 30s pour concentrer localement les billes puis un champ faible (1mT) pendant 10 min pour faciliter la reconnaissance sous champ. Ce nouveau protocole de champ magnétique s'appuie sur une observation microscopique. La première application du champ magnétique de 50 mT permet de concentrer très localement les billes puis la valeur de 1 mT conserve les billes sous forme de chaines tout en leur laissant une certaine liberté de rotation due à l'agitation thermique. La solution de billes est diluée au centième avant d'être injectée dans le cytomètre.

3.2.2 Résultats

La population de billes agrégées est comptabilisée car elle rend compte de la quantité en antigènes présente en solution. Une forte concentration en analyte se caractérisera par un nombre important d'agrégats. La variation de billes agrégées présentées figure 3.29 correspond à la différence d'agrégats après champ entre l'échantillon et la solution témoin. Le taux d'agrégation de l'échantillon témoin (sans BSAb) est de 15,98 % avec un écart-type (σ) de 2,4 % sur 29 mesures. Ce taux de non spécifique est assez élevé en raison du fort taux de greffage. Nous savons que nous pouvons diminuer ce taux en greffant nous-mêmes les billes. Cette voie n'est pas investiguée car elle permet de gagner seulement quelques pourcents, qui à ce stade de l'étude ne sont pas essentiels.

Comme on le voit sur la figure 3.29, les mesures sont reproductibles. Elles ont toutes été réalisées au minimum 2 fois avec les solutions de BSAb. La spécificité est également validée en utilisant des solutions de BSA où aucune variation de signal n'a été enregistrée. Sa sensibilité est évaluée à 1 pM (3σ). Il permet de doser

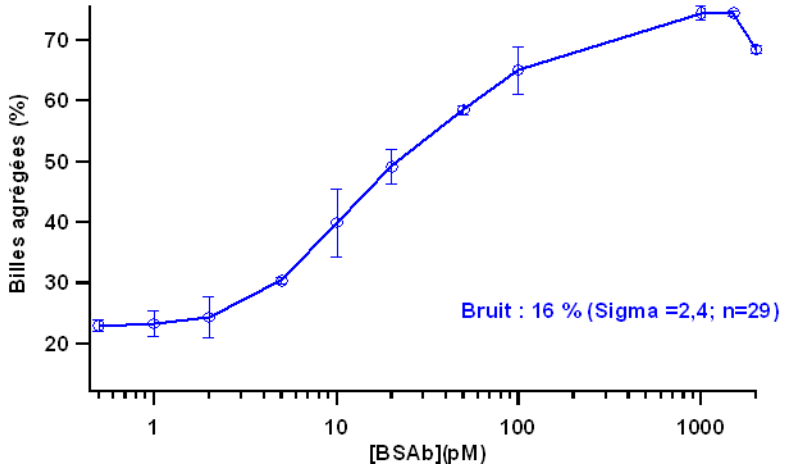


FIGURE 3.29 – Evolution du pourcentage de billes agrégées en fonction du logarithme de la concentration en BSAb. Pour [BSAb]= 0,5 ; 5 ; 100 ; 1500 et 2000 pM, n=2 - pour [BSAb]= 50 pM, n=3 - pour [BSAb]= 1000 pM, n=4 - pour [BSAb]= 1 ; 2 et 20 pM, n=6 - [BSAb]= 10 pM, n=8.

la BSAb en milieu tamponné sur une large gamme de 1 à 200 pM en un temps court de 20 min (10 min d'incubation et 10 min de champ).

D'après les résultats présentés figure 3.29, les billes de 1 μm de diamètre ne permettent pas d'améliorer la sensibilité du test d'agglutination. En regardant un peu plus en détails ces données, nous nous apercevons que la réactivité des billes est très faible. Cette caractéristique représente le nombre de liens formés correspondant au nombre de billes agrégées divisé par 2 par rapport au nombre d'antigènes en solution (ici BSAb) soit

$$\text{Réactivité} = \frac{N_{liens formes}}{N_{BSAb}} \times 100$$

Pour ce test, elle est très faible autour de 0,1 %, cinq cent fois plus faible que celle établie pour les billes de 200nm ($\sim$ 50%). Ainsi, la quantité minimale détectable correspond à une centaine de BSAb par bille contrairement aux billes de 200 nm où l'on peut détecter moins d'une BSAb par bille, ce qui représente l'optimum.

La suite de notre étude va porter sur la compréhension de cette faible réactivité à travers les études du temps de capture de la BSAb et du champ magnétique

appliqué.

3.2.3 Caractérisation

Temps d'incubation

Avec les billes de 1 μm, nous travaillons en excès d'antigènes, le temps de réaction (τ) s'écrit alors :

$$\tau = \frac{1}{d_+[BSAb]} \tag{3.16}$$

Pour une bille de 1 μm de diamètre et un antigène de 10 nm de diamètre (taille approximative de la BSAb), la constante cinétique d'association de Smoluchowski d_+ vaut $1,6.10^{11} m^2.s^{-1}$. Elle est dix fois plus élevée que pour les billes de 200 nm.

Traçons le temps de capture en fonction de la concentration en BSAb pour les deux tailles de billes utilisées (200 nm et 1 μm) (figure 3.30). On suppose que [BSAb] » [Billes].

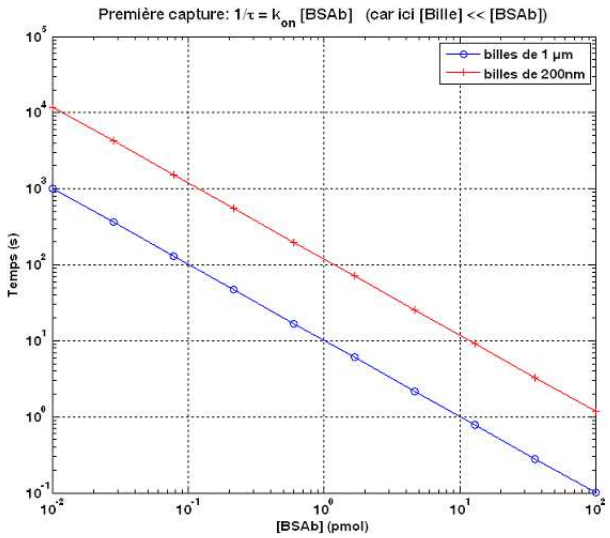


Figure 3.30 – Evolution du temps de capture des ligands en solution en fonction de la concentration en BSAb pour deux tailles de billes (200 nm ; croix et 1 μm ; cercle).

Ce calcul montre une nouvelle fois l'avantage de travailler avec de "gros" objets. La cinétique d'association est gouvernée par la diffusion de la plus petite espèce -

l'antigène - et grâce à l'important volume occupé par nos billes, cette reconnaissance est accélérée. Ces billes de 1 μm permettent de diminuer d'un facteur dix la vitesse de première capture qui devient limitante aux très faibles concentrations en analyte (problématique détaillée au chapitre IV). Pour une concentration de 10 fM d'analyte, le temps de capture est de trois heures pour les billes de 200 nm et chute à une vingtaine de minutes avec les billes de 1 μm. Normalement, aux concentrations de BSAb testées, supérieures à la picomole, ce temps de capture n'est pas limitant (inférieur à 1 s). Afin de s'en assurer, nous testons trois temps d'incubation 1, 10 et 50 minutes (figure 3.31).

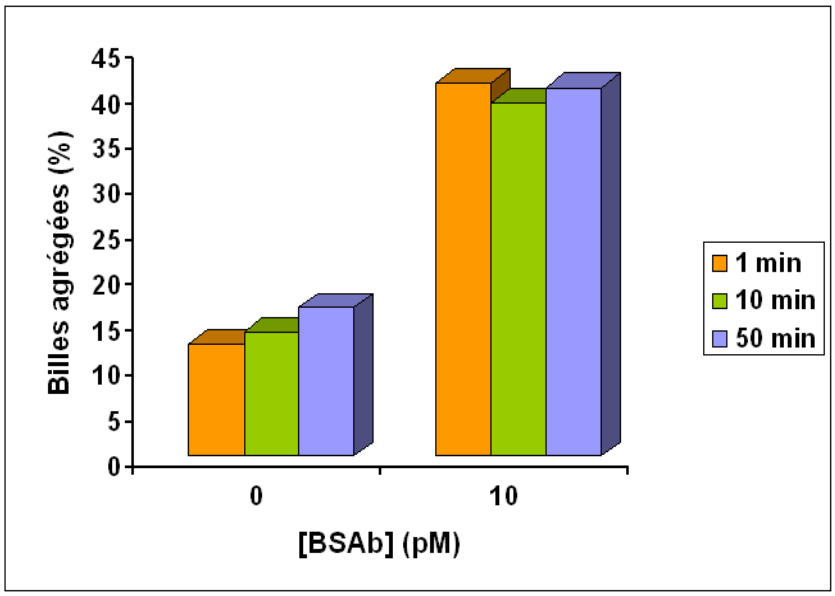


Figure 3.31 – Représentation du pourcentage de billes agrégées à 0 et 10 pM de BSAb pour trois temps d'incubation.

D'après les résultats obtenus figure 3.31, un long temps d'incubation favorise légèrement le non spécifique (+ 0,8 %/ min). Le signal spécifique semble indépendant de ce temps d'incubation. Cette indépendance montre la rapidité de cette première étape, après une minute, tous les antigènes en solution sont capturés. Pour des raisons pratiques, le temps d'incubation n'a pu être diminué. Nous n'avons pas vérifié l'hypothèse d'une possible adsorption non spécifique de la BSAb sur les parois du contenant car il s'agit des mêmes tubes que ceux utilisés avec les billes de

200 nm de diamètre. L'assurance d'une capture totale a été réalisée en quantifiant le surnageant par dosage en retour via le test d'agglutination dont la sensibilité est la picomole. Ce dosage a été réalisé avec plusieurs concentrations de BSAb. Les résultats montrent une première capture totale, la cinétique n'est donc pas limitante.

Aucun travail concernant le bloquage des contenants n'a été réalisé pour s'assurer qu

Il en est de même pour la thermodynamique car nous travaillons avec un couple ayant une très forte affinité ($10^{14} - 10^{15} M^{-1}$)

Ainsi, toute la BSAb en solution est capturée par nos billes. Le problème de la réactivité des billes se situe au niveau de la deuxième reconnaissance lors de l'application du champ magnétique.

Champ magnétique

L'équipe de D. Bensimon a montré à travers ses expériences de "déroulement" d'ADN que les billes magnétiques sont anisotropes en présence d'un champ magnétique [68]. L'anisotropie résulte du couplage des grains de maghémite, contenu dans les billes, selon la direction du champ. Ce couplage est proportionnel à la racine carré du nombre de grains de maghémite. Ainsi, pour des grosses billes, ce couplage est très fort ce qui ralentit la rotation de la bille sous champ magnétique.

Afin d'encourager la rotation de ces billes sous champ, un faible champ magnétique, à la limite de la formation de chaînes, est appliqué pour les soumettre au maximum à l'agitation thermique.

Valeur du champ magnétique

La faible concentration de billes choisie nécessite d'appliquer dans un premier temps, un champ magnétique élevé afin de concentrer localement les billes. Une fois les chaînes formées, un champ plus faible est appliqué pour encourager la rotation des billes et faciliter la reconnaissance spécifique. Le temps de la première étape est fixée à 30 s après observation au microscope de la solution ; temps nécessaire pour regrouper quasiment toutes les billes. Le temps d'application du champ faible est fixé à dix minutes comme pour les billes de 200 nm mais fera également l'objet

d'une optimisation.

Deux concentrations de BSAb sont testées (5 et 10 pM) (figure 3.32). A ces concentrations, nous savons que nous formons des agrégats.

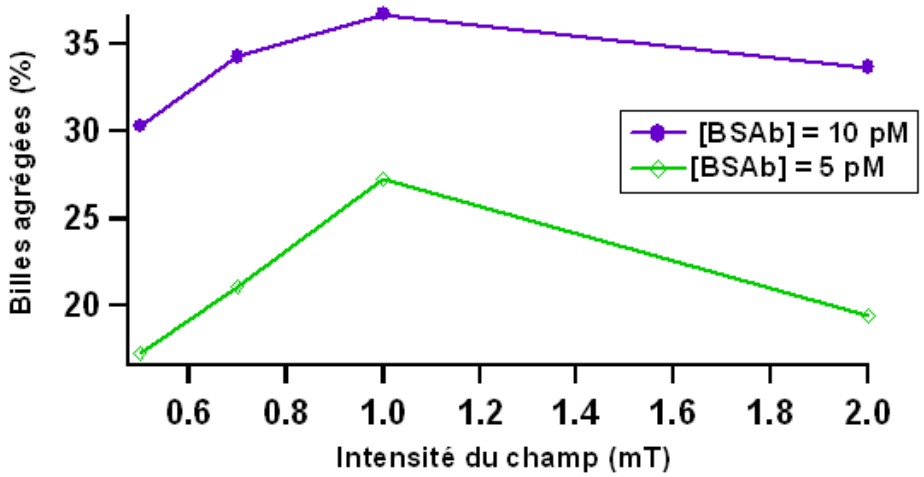


Figure 3.32 – Evolution du pourcentage de billes agrégées en fonction de l'intensité du champ magnétique appliqué. La concentration de billes est de 0,1 pM. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

Le champ magnétique conditionne également la distance inter-particule [62]. En dessous de 1 mT, les billes sont trop éloignées pour former des chaînes. Au dessus de cette valeur, la rotation des billes semblent être ralenties. Ainsi, un champ magnétique de 1 mT permet la rotation des billes et donc la reconnaissance dans le temps imparti de 10 min. Regardons maintenant si ce temps d'application est optimal.

Temps d'application du champ magnétique

Le protocole décrit précédemment est appliqué. Seul le temps d'application du champ faible varie (figure 3.33).

Le signal est maximal après dix minutes d'application du champ magnétique pour les deux concentrations en BSAb testées et dépend du nombre d'antigènes par bille. Pour une concentration en BSAb de 5 pM, la réponse maximale est obtenue après cinq minutes de champ magnétique et lorsque cette concentration double, le temps fait de même. Ce résultat est tout à fait contre intuitif. On aurait tendance

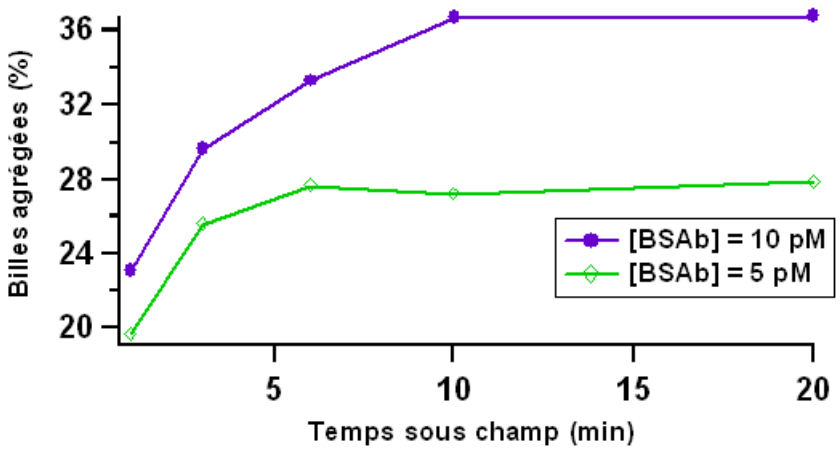


Figure 3.33 – Evolution du pourcentage de billes agrégées en fonction du temps d'application du champ magnétique de 1mT. La concentration de billes est de 0,1 pM. Un champ magnétique fort de 50 mT est appliqué pendant 30s avant l'application du champ faible. Le temps d'application du champ magnétique faible est de 10 min. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

à penser que plus le nombre de BSAb est important à la surface de la billes, plus la formation d'agrégats est rapide. Ce long temps de reconnaissance peut révéler la grande limitation de la rotation des billes sur la vitesse de reconnaissance et/ou un nombre très faible de streptavidines réactives. La probabilité de "trouver" un récepteur libre (ici la streptavidine) sur la surface en regard diminue avec le nombre de BSAb capturée.

Pour la suite de notre étude, nous allons appliquer un champ magnétique de 1 mT pendant 10 minutes car notre but est de détecter de faibles concentrations ($<$ 10 pM).

Application du champ magnétique

La valeur et le temps d'application du champ magnétique, définis ci-dessus, sont apparemment optimaux mais n'encouragent pas suffisamment la reconnaissance sous champ. Cette reconnaissance semble grandement liée à la rotation des billes. L'application d'un champ magnétique séquentiel devrait améliorer l'exploration des surfaces en regard. Le protocole magnétique établi précédemment (30s, B=50 mT ; 60s, B=1 mT) est appliqué plusieurs fois avec une phase de relaxation

d'une minute. Le pourcentage de billes agrégées de l'échantillon témoin en fonction du nombre de cycles est d'abord étudié (figure 3.34) car il permet de prédire la sensibilité du test qui dépend de la valeur de l'écart-type de la mesure faite en absence d'antigènes. Plus ce taux augmente, plus la sensibilité diminue.

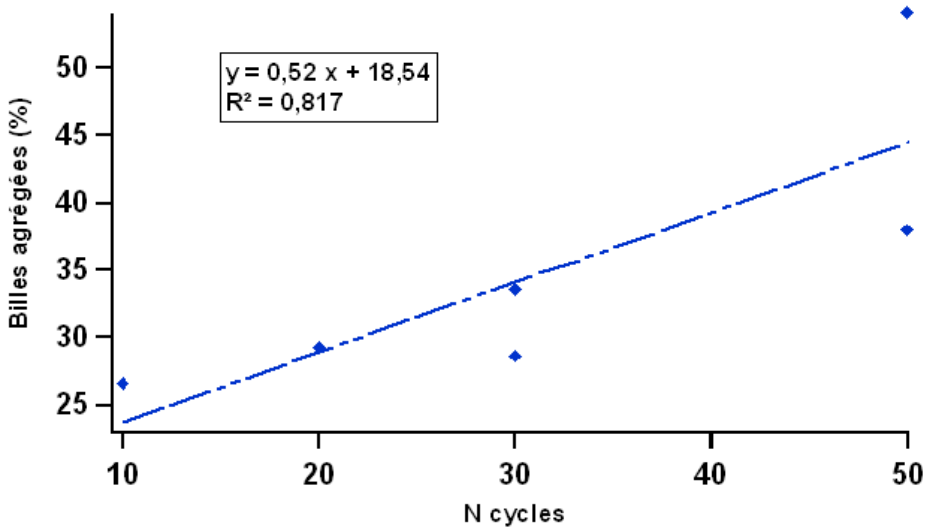


Figure 3.34 – Evolution du pourcentage de billes agrégées de l'échantillon Témoin en fonction du nombre de cycles de champ magnétique. Un champ magnétique fort de 50 mT est appliqué pendant 30s avant l'application du champ faible. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

Bien que le nombre de points effectués soit faible, une tendance ressort nettement : le nombre de cycles influence grandement le pourcentage de billes agrégées. La dispersion des points à 30 et 50 cycles est due à la valeur élevée de l'agrégation ; comme déjà observé sur les billes de 200 nm, l'écart-type est relié à la valeur moyenne. A durée égale d'application du champ magnétique faible (10 min), l'application alternative du champ magnétique augmente le taux d'agrégation de 10 % à cause des nombreuses applications du champ magnétique fort (10 fois au lieu de 1 fois).

Regardons maintenant, le pourcentage de billes agrégées en présence de BSAb (figure 3.35). La quantité de billes présente en solution est toujours de 0,1 pM.

Le pourcentage de billes agrégées varie linéairement avec le nombre de cycles. La

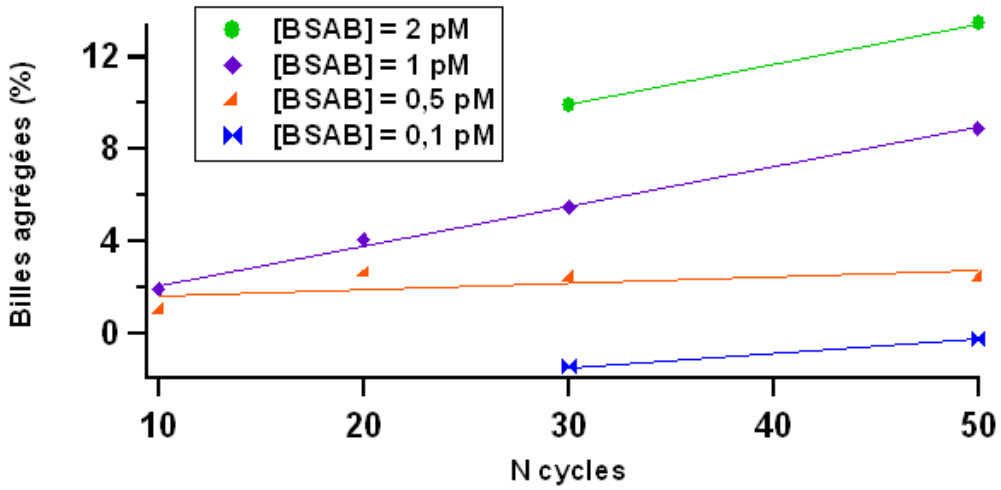


Figure 3.35 – Evolution du pourcentage de billes agrégées en fonction du nombre de cycles de champ magnétique pour quatre concentrations en BSAb (0,1 ; 0,5 ; 1 et 2pM). Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

pente est assez similaire quelques soient les concentrations de BSAb et vaut environ 0,2. Cette faible pente corrélée à celle de l'échantillon témoin reflète l'intérêt limité de ce mode d'application. La réactivité est très peu améliorée contrairement au bruit.

3.2.4 Discussions

Toutes ces expériences convergent vers une très faible réactivité des billes utilisées. Il s'avère que ces billes sont très poreuses. Leur surface comporte de nombreuses aspérités ce qui diminue l'accessibilité des BSAb une fois liée à la surface de la bille. Le taux effectif de BSAb est donc très faible. La même analogie peut être faite avec les streptavidines greffées sur ces billes. Lorsque deux billes sont en regard, peu de streptavidines se trouvent dans une bonne configuration d'adhésion. De plus, le polymère utilisé pour encapsuler les billes diffère de celui des billes de 200 nm ce qui peut également gêner la reconnaissance spécifique via des répulsions stériques, électrostatiques, hydrophobes....

Malgré la très faible réactivité des billes (proche de 0,1 %), nous arrivons à dé-

tecter la picomole. En choisissant un matériau mieux adapter, ayant une réactivité de quelques dizaines de pourcents, il est légitime de penser que la sensibilité en serait également augmentée. La dizaine de femtomoles pourrait être atteinte.

3.3 Conclusion

L'étude approfondie des paramètres colloïdaux n'a pu aboutir à l'amélioration de la sensibilité du test d'agglutination précédemment développé au laboratoire. La quantité de billes et leur design étaient en fait optimaux. L'unique possibilité d'évolution se situe au niveau de l'augmentation de la taille des billes qui permettrait d'augmenter le signal et de diminuer le bruit. Malheureusement, la taille optimale prédit par la théorie n'est pas disponible dans le commerce.

A la vue des simulations numériques des paramètres alpha et de la section efficace de diffusion d'un singulet en fonction du rayon des billes, nous nous apercevons que le signal chute uniquement à cause du paramètre alpha. Autrement dit, plus les billes sont grosses, plus l'intensité diffusée par un doublet égale celle de deux singulets. Une détection individuelle des billes nous permettrait de nous affranchir de ce paramètre. Ceci est possible grâce à la cytométrie en flux. Cette nouvelle méthode de détection, basée sur l'intensité diffusée par les billes, est théoriquement plus sensible que la turbidimétrie car elle caractérise individuellement les objets et recueille simultanément deux signaux (en FSC et SSC). Malheureusement, le gain en sensibilité n'a pu être clairement démontré car les billes utilisées se sont avérées peu réactives, du fait d'une porosité importante. Afin de continuer dans cette voie, les efforts doivent portés sur la recherche d'un matériau réactif. Une chose est certaine, l'utilisation de grosses billes est bénéfique car elles amplifient la lumière diffusée, repoussent les limites thermodynamiques liées aux faibles concentrations en analyte tout en travaillant avec de faibles quantités de billes et sans augmenter la cinétique de réaction.

Le prochain chapitre va porter sur ce dernier point, la cinétique de réaction car la recherche de sensibilité ne doit pas être au détriment du temps d'un test. Or, nous nous sommes aperçus que le temps de capture (temps de la 1^{ere} étape)

de notre test d'agglutination devenait très longs aux faibles concentrations en antigènes (figure 3.30). Cette première étape est en effet, soumise à la diffusion des antigènes contrairement à la deuxième où le champ magnétique permet de s'en affranchir. Une solution serait d'amener directement l'antigène au contact des billes. Cette manipulation est possible avec les microsystèmes. A travers la collaboration européenne DetectHIV, un système microfluidique permettant la rétention de billes magnétiques à travers un canal microfluidique, tout en faisant passer un échantillon, a été mis au point par l'équipe de M. Gijs [59]. Les résultats obtenus sur ce système dans le cadre de ce réseau européen font l'objet du prochain chapitre, les autres résultats sont regroupés et présentés dans le dernier chapitre.

Chapitre 4

Un nouveau format fluidique pour de meilleures performances

4.1 Introduction

Dans les années 90, le format microfluidique s'est avéré très prometteur pour atteindre des seuils de détection sensible notamment via des mesures d'absorbance et répondre au marché du point of care (test rapide, transportable et peu coûteux).

Dans le cadre du projet européen DetecHIV, nous avons décidé d'utiliser ce format en vue de franchir les barrières cinétique et thermodynamique imposées par notre test d'agglutination magnétique. L'objectif est la détection du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) via la protéine p24, protéine de la capside, à un stade très précoce de l'infection. Une grande sensibilité de l'ordre de la femtomole ($10^{-15}M$) est donc visée. La clef de voute de ce projet est un système de préconcentration inspiré de celui existant en chromatographie. En analytique, des supports spécifiques, constitués d'anticorps ou de cellules sous forme de cartouches, de colonnes ou de disques, sont élaborés en vue de retenir spécifiquement l'analyte cible lors du passage de l'échantillon. Ainsi, le composé d'intérêt est sélectionné parmi tous les interférants et concentré au fur et à mesure du volume percolé. Dans notre cas, ce système sélectif se compose de billes magnétiques sur lesquelles des anticorps sont greffés. Ces billes sont retenues très localement dans le canal

microfluidique sous forme de "tas" (figure 4.1) perméable à l'échantillon, appelé plug, rendant l'extraction de l'antigène et sa préconcentration possibles.

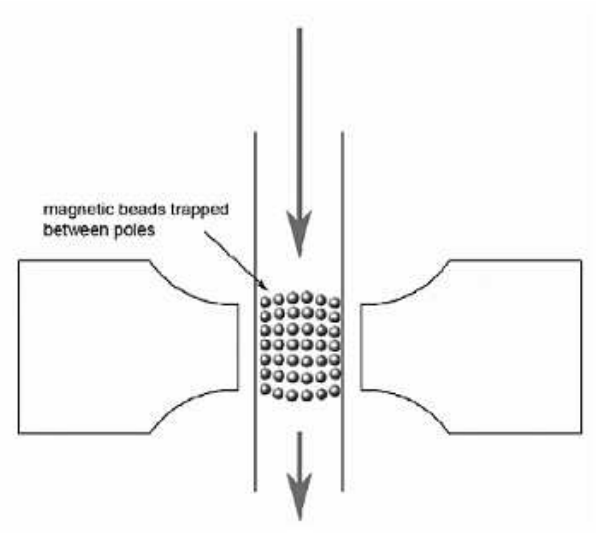


Figure 4.1 – Représentation schématique du principe de préconcentration en microfluidique

Un premier dimensionnement permet d'établir ce réel gain en concentration.

4.1.1 Premier dimensionnement

En supposant une capture totale, l'efficacité de ce système se base sur le rapport entre le volume de l'échantillon injecté et le volume du plug. Plus ce rapport, appelé r, est grand, plus la préconcentration est efficace.

Considérons le volume du plug égal à 1 nL ($100^3 \mu m^3$) et le débit de l'échantillon à travers ce plug de 0,1 $\mu L/s$. En 5 min, 30 μL d'échantillon sont injectés. Si la capture est totale, la concentration en antigène est augmentée 30000 fois (r= 30 μL /1 nL).

Ainsi, l'efficacité du système de préconcentration se mesure par le rendement de capture et par le rapport r, ratio du volume d'échantillon percolé sur le volume du plug. Le rendement de capture est déterminé par la géométrie du test et le mode d'agitation des billes. Une fois ces paramètres fixés, seul le volume d'échantillon

percolé permet d'augmenter artificiellement la concentration en analyte.

La rétention des billes pour former le plug et leur agitation pour améliorer la capture lors de la percolation de l'échantillon sont primordiales. Ces systèmes existent déjà depuis quelques années mais l'application du champ magnétique n'est pas optimale. Elle se fait soit par l'intermédiaire d'un aimant permanent engendrant de gros agrégats (champ magnétique fort) [58, 57], soit par une bobine magnétique (champ magnétique faible) ne retenant que très faiblement les billes [69, 70].

Un système composé de quatre pôles magnétiques (deux aimants permanents et d'une bobine) présenté figure 4.2 est élaboré à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). Grâce à la présence des deux aimants permanents et à l'alternance de polarité des pointes magnétiques, les billes bougent circulairement dans le canal microfluidique le long des lignes de champ (Nord - Sud) pendant l'injection de l'échantillon. Elles explorent 45 % du volume du plug.

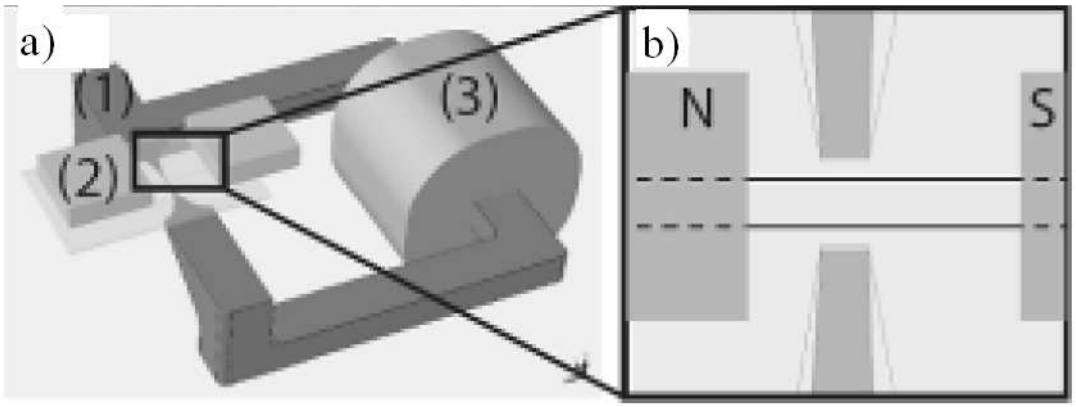


Figure 4.2 – a) Vue schématique du système d'activation magnétique mis au point par l'EPFL (1) pointe magnétique (2) aimant permanent et (3) bobine. b) Zoom sur la configuration des pôles magnétiques près du canal microfluidique. Les aimants permanents ne sont pas placés symétriquement par rapport aux pointes magnétiques positionnées verticalement. Schémas fournis par l'EPFL.

Ce quadrupôle magnétique est intégré à une puce microfluidique (figure 4.3).

Les contraintes technologiques étant fixées et déterminées, un second dimensionnement est nécessaire pour s'assurer de la capture des antigènes en milieu réel.

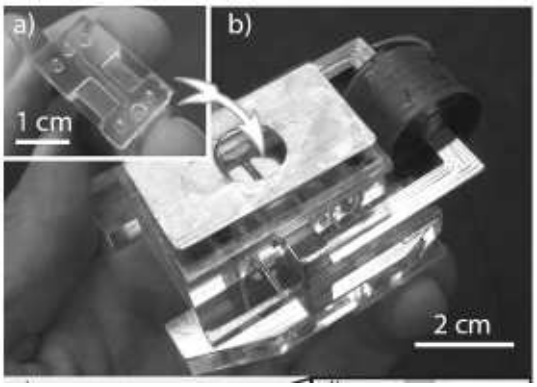


Figure 4.3 – Photo de la puce microfluidique de rétention. a) puce microfluidique. b) Support de la puce permettant son fonctionnement

4.1.2 Deuxième dimensionnement

Ce calcul se base sur le protocole établi par Y. Moser qui sera explicité dans le prochain paragraphe.

Thermodynamique

La thermodynamique permet de « prédire » si une réaction chimique (ou ici biologique) est possible ou non. En raison des contraintes physique, technologique et de conception, plusieurs paramètres sont déjà fixés et récapitulés table 4.1.

Contraintes	**Données d'entrée**
Billes bougent dans un plan de **45 µm** de haut, le volume exploré est de 0, 45 nL.	Volume du plug: **1nL**
Flux maximal de l'échantillon : **1 nL/s**	Durée de l'aspiration: **5 min**
	300 nL d'échantillon sont aspirés avec un flux de 1 nL/s

Table 4.1 – Table récapitulative des contraintes et données d'entrée de la puce microfluidique de rétention.

Il reste à déterminer la concentration minimale de billes dans le plug pour

former un complexe en s'assurant de sa réalité pratique. Cette concentration dépend de la constante thermodynamique de dissociation K_D. Cette valeur est fixée à $10^{-8}M$ car elle reflète les valeurs habituelles des couples antigène-anticorps.

Les billes bougent sur une distance de 45 μm. Le volume ainsi exploré est assez important ; il représente approximativement la moitié du volume du plug. Le débit de l'échantillon à travers le plug est de 1 nL/s. Au delà de ce débit, les billes risquent de se "décrocher" du plug. Ce débit correspond à la valeur maximale de débit applicable. 300 nL passent au travers des billes en 5 min. La concentration en antigène dans le plug est ainsi de :

$$[antigene]_{plug} = \frac{[antigene]_{echantillon} * V_{injecte}}{V_{exploreparlesbilles}}$$

AN :

$$[antigene]_{plug} = \frac{4.10^{-15}.3.10^{-7}}{0,45.10^{-9}}$$

$$[antigene]_{plug} = 3pM$$

Grâce à ce dispositif, la concentration en antigène est concentrée 1000 fois. Pour favoriser encore grandement la formation de complexes immuns, la concentration en anticorps dans le plug doit être au moins 10 fois supérieure à celle de la constante de dissociation c'est-à-dire une concentration en anticorps de 10^{-7}M. Avec cette valeur, 90% des antigènes en solution devrait être capturé. Si nous nous reprenons le taux de greffage utilisé avec les 200 nm soit 2% , nous obtenons un nombre d'anticorps par bille égal à 4000. Ainsi, le nombre de billes dans le plug est de :

$$N_{billes} = \frac{[Anticorps]_{plug}}{N_{anticorps/bille}}.V_{plug}.N_A$$

15 000 billes doivent être capturées dans le plug, ce qui représente 8 % du volume total du plug. Le passage de l'échantillon à travers le plug est tout à fait possible.

Cinétique

La réaction d'association entre les antigènes et les anticorps est thermodynamiquement possible. Maintenant, il faut calculer le temps minimal nécessaire à la formation de ce complexe à partir des données récapitulées table 4.2 afin de définir le débit maximal applicable.

Ce temps dépend de la taille des espèces et des propriétés physiques du milieu telles que la viscosité η et la température T, catalyseur pour la diffusion.

Contraintes	Données d'entrée
Temps de contact dans le plug : 0,8 s	Constante de diffusion pour chaque élément: Billes $D_{1\mu m}$=3.10^{-13} m^2.s^{-1} Protéine D=3.10^{-11} m^2.s^{-1}

Table 4.2 – Table récapitulative des contraintes et des données d'entrée pour déterminer le flux.

La concentration en billes est en excès, le temps de capture τ vaut :

$$\tau = \frac{1}{[billes]_{plug}.d_+}$$

Pour un antigène de taille standard, $R = 5$ nm et une sphère uniformément réactive de rayon 500 nm, on obtient $d_+ = 1,6.10^{11} M^{-1}.s^{-1}$.

AN : τ= 0,02 s

Reste à comparer ce temps avec le débit maximal possible pour ne pas arracher les billes du plug c'est-à-dire 1 nL/s.

Ce flux de 1 nL/s à travers la section de 8500 μm^2 correspond à une vitesse de 120 $\mu m/s$. L'antigène reste 0,8 s dans le plug. Ce temps est très supérieur au temps de capture. La réaction d'association est alors cinétiquement possible.

Les contraintes thermodynamiques et cinétiques sont assurées d'être franchies, place à l'expérience.

Dans un premier temps, je présenterai le fonctionnement du système de préconcentration, puis ses performances établies au laboratoire avec la méthode de

détection quantitative : la cytométrie en flux.

4.2 Système de préconcentration

Le système microfluidique de préconcentration a été développé à l'EPFL [59] sous la direction de M. Gijs. Il a fait l'objet d'un long travail d'optimisation au niveau de sa géométrie et de l'activation des billes pour capturer efficacement l'antigène.

Les billes de 1 μm de diamètre (Dynabeads MyOne Streptavidin) sont utilisées pour leur détection cytométrique et pour leur taux élevé en oxyde de fer les rendant facilement manipulable.

4.2.1 Fonctionnement

Ce système est le siège d'un test immunologique d'agglutination magnétique (figure 4.10). Le protocole mis au point par Y. Moser [59] comprend quatre étapes. Les billes greffées avec l'anticorps spécifique (dans notre cas la streptavidine) sont injectées dans le canal et immobilisées très localement sur les côtés du canal au niveau des pointes magnétiques. Ensuite, l'échantillon est introduit. Les paramètres magnétiques sont ajustés pour générer un mouvement cyclique des billes perpendiculairement au canal, qui occupent un très faible volume. L'activation de ce plug magnétique augmente la capture de l'analyte lors du passage de l'échantillon. La formation d'agrégats est obtenue en confinant les billes sur le côté du canal pendant quelques minutes. L'étendu du plug à travers le canal est caractéristique de la présence d'antigènes. Une grande étendue signifie une faible reconnaissance spécifique.

4.2.2 Montage magnétique et microfluidique

Le système intègre une partie magnétique composée de quatre pôles et une simple puce microfluidique avec un canal (figure 4.5)[59]. Le champ magnétique est généré par une bobine extérieure et guidé par un corps magnétique jusqu'aux

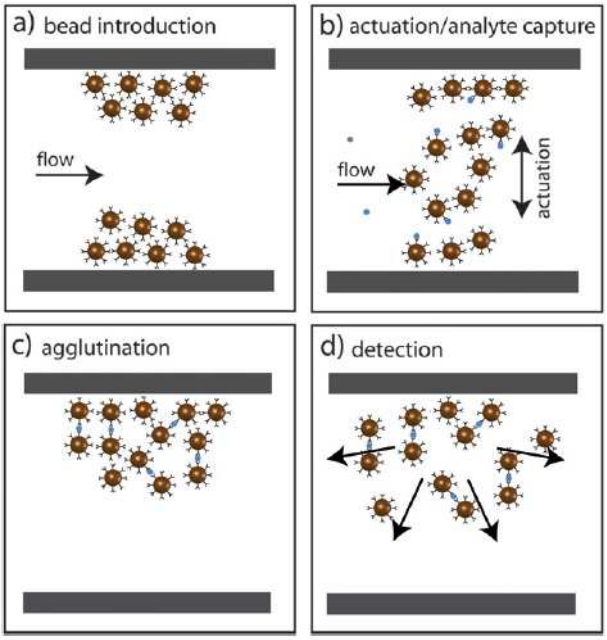


Figure 4.4 – Principe du test immunologique d'agglutination magnétique sur puce : (a) Les particules magnétiques fonctionnalisées sont injectées et retenues magnétiquement dans le canal microfluidique. (b) Les particules magnétiques sont agitées pendant la percolation de l'échantillon. (c) Après le passage de l'échantillon où l'antigène a été capturé par les billes, les billes sont immobilisées sur le côté du canal pour permettre la formation d'agrégats. (d) Le champ magnétique est arrêté et les billes sont relâchées [59].

pointes magnétiques situées sur la puce. Ces pointes magnétiques ont pour dimension $100\mu m \times 100\mu m$ pour focaliser le champ magnétique à travers le canal. Elles sont positionnées au plus près du canal microfluidique pour confiner le champ magnétique sur une petite région. Typiquement, la valeur du champ magnétique entre ces pointes obtenue par la méthode des éléments finis (FEM) est comprise entre 100 et 150 mT. Deux petits aimants permanents sont positionnés au dessus du microcanal (figure 4.5a) afin de générer un champ magnétique comparable à celui des pointes magnétiques et permettre la circulation des billes dans le canal. Une photographie du système complet est présentée figure 4.5b. La figure 4.5c est une vue schématique du mouvement des particules magnétiques à travers le canal (dynamique plug) lors du passage de la solution d'analyte. La puce microfluidique est composée de PDMS (polydiméthylsiloxane) et de verre et comprend un unique

canal ($100\mu m \times 100\mu m \times 2cm$). Cette puce est maintenue par un support offrant un réservoir ($10\mu L$) pour les billes et l'échantillon à l'entrée de la puce. Le pousse seringue est connecté à la sortie.

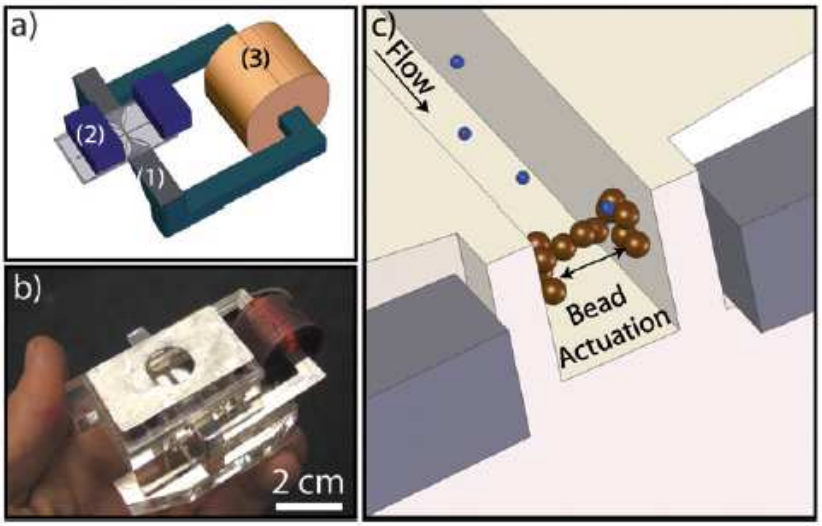


Figure 4.5 – Vue schématique de la puce microfluidique et du système d'activation magnétique comprenant deux pointes magnétiques (1), deux petits aimants permanents (2) et une bobine (3). (b) Photographie de tout le système. Les aimants permanents sont placés sous une petite plaque de fer au dessus de la puce. (c) Vue schématique en 3D du déplacement des billes à travers le canal microfluidique entre les pointes magnétiques et la percolation d'échantillon [59].

4.2.3 Résultat

2 μL de billes à 0,2 pM soit 20000 billes sont aspirées et retenues dans le canal. Ces billes sont dans du tampon phosphate à 100 mM, pH=6,7 avec 0,4 % de F-127. L'échantillon est injecté à 1 nL/s pendant 12 minutes à travers le plug. Un courant alternatif alimente la bobine pour créer un plug dynamique. Une fois tout l'échantillon injecté, les aimants permanents sont retirés, les billes sont regroupées sur un côté du canal et laissées quelques minutes pour former des agrégats spécifiques. La bobine est finalement démagnétisée libérant les billes dans le canal. Le signal mesuré correspond à leur étalement (figure 4.6). Le nombre de pixels est comptabilisé.

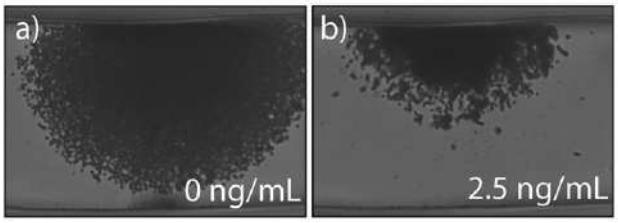


Figure 4.6 – Photo du plug après arrêt du champ magnétique et passage de l'échantillon contenant 0 et 2,5 ng.mL^{-1} de BSAb ($M_{BSAb} = 65000 g.mol^{-1}$) [59].

Avec les billes commerciales Dynabeads MyOne Streptavidin, l'équipe de M. Gijs détecte environ 3 pM de BSAb en 12 min en milieu tamponné (figure 4.7). La mesure est reproductible (signal peu bruité) mais est fastidieuse et peu précise.

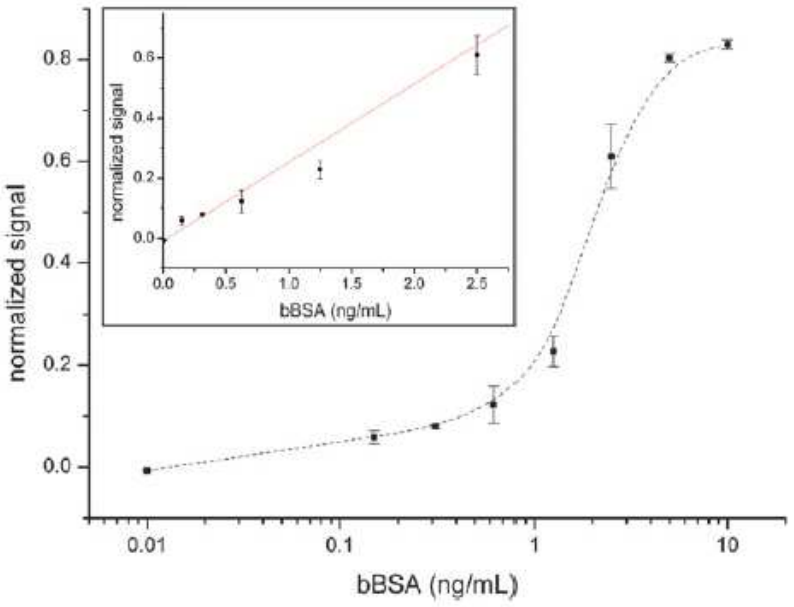


Figure 4.7 – Courbe de dosage de la BSAb en milieu tamponné [59].

Afin d'établir plus précisément la limite de détection et une caractérisation complète de ce système, une détection cytométrique - détection quantitative - en dehors de la puce va être mise en place. Cette partie a été réalisée au laboratoire LCMD sur une puce dupliquée par l'EPFL.

4.3 Couplage avec la cytométrie en flux

Les protocoles fluidique et magnétique définis par Y. Moser sont repris. Notre mode de détection cytométrique nécessite de récupérer les billes une fois ces protocoles appliqués. Pour cela, 10 μL de liquide sont injectés à travers la puce pour collecter toutes les billes au niveau du réservoir d'entrée. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, ces billes sont récupérées et diluées au centième pour être analysées au cytomètre.

4.3.1 Validation des principes

Efficacité de la capture

Cette évaluation est faite à partir de solutions fluorescentes de biotines d'isocyanate de fluoresceine, notée bFITC. Ces solutions sont injectées, tout comme les solutions de BSAb, à travers le plug avec les mêmes spécifications. Les billes sont ensuite injectées dans le cytomètre pour comptabiliser le nombre de bFITC par bille. Le cytomètre classe les objets suivant leur taille mais également suivant leur intensité de fluorescence. Ainsi, nous pouvons remonter directement aux nombres de bFITC par bille.

La fluoresceine (nom commun de l'isocyanate de fluoresceine) des biotines est excitée à 488 nm et son intensité est recueillie à 520 nm. Les solutions étalons de ce dosage sont des solutions où l'on a mélangé en volume les solutions de billes et de bFITC. La capture étant totale lors de cette expérience (déterminée chapitre III), nous connaissons exactement le nombre de bFITC par bille pour une concentration donnée.

En raison de la sensibilité du cytomètre, le signal fluorescent mesurable est de l'ordre de 1000 bFITC par bille. Le signal obtenu pour ces échantillons étalons est présenté figure 4.8

La concentration de la solution de bFITC injectée à travers le plug est de 10 nanomoles. Afin d'obtenir un signal détectable au cytomètre, le temps de percolation est augmenté, il passe à une heure au lieu de 12 min. L'influence du débit

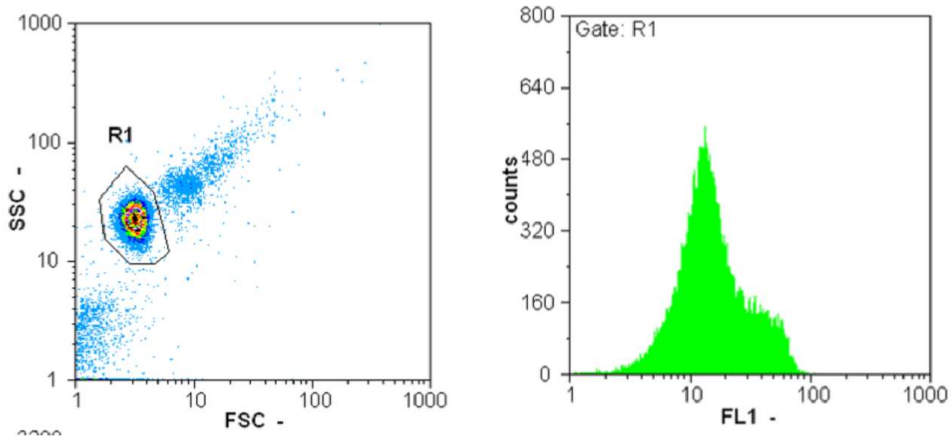


Figure 4.8 – Mesure de référence : billes greffées avec des streptavidines mélangées avec une solution de bFITC. Le graphique à gauche, représente le signal en SSC en fonction de celui en FSC. Il permet de discriminer la population de singulets (R1). A droite est représenté l'histogramme fluorescent de cette population de singulets à 520 nm (gain 900).

sur la capture est également testé avec un débit dix fois plus élevé. Les résultats obtenus sont présentés table 4.3.

Débit (nL/s)	**Temps de percolation (min)**	**Nombre de bFITC/bille**	**Si capture TOTALE**	**Rendement (%)**
1,4	60	7.10^4	10^5	70
14	12	7.10^4	2.10^5	35

Table 4.3 – Table présentant les conditions et les résultats expérimentaux obtenus lors de l'évaluation de l'efficacité de la capture du plug

Compte tenu de la sensibilité de notre mesure de fluorescence, la capture d'antigènes à 1 nL/s est quasi totale. Lorsque le débit est augmenté d'un facteur dix, le rendement de cette capture semble diminuer de moitié. Ceci est à relier avec la perte de "quelques billes" pendant la percolation de l'échantillon et une possible saturation des billes en raison de la valeur identique du nombre de bFITC par bille obtenu pour les deux débits testés (7.10^4 bFITC/bille). L'efficacité de capture du plug en présence de débits élevés ne peut être complètement établie.

Au débit classique, ce système microfluidique répond entièrement aux objectifs fixés au niveau de la capture de l'antigène. Regardons maintenant s'il peut améliorer la réactivité des billes.

Réactivité

Un point avec deux fois plus de billes est également testé afin d'augmenter la fréquence colloïdale de rencontre ; paramètre favorisant la formation d'agrégats spécifiques. Deux concentrations de BSAb sont injectées 1 et 10 pM. Les résultats sont présentés table 4.4. Le nombre de BSAb/bille est calculé pour une capture supposée totale ainsi que la réactivité.

Rappel :

La Réactivité $= \frac{N_{liens formes}}{N_{BSAb}} \times 100$, ce qui équivaut dans le cas présent à :

$$R = \frac{\%_{billes agregees}}{2.N_{BSAb/bille}} \tag{4.1}$$

Nombre de billes dans le plug	20000		40000	
$[BSAb]_{injectee}(pM)$	1	10	1	10
$N_{BSAb/bille}$	5	50	2,5	25
Billes agrégées (%)	25,7	36,9	30,7	55,9
Réactivité (%)	2,6	0,4	6,1	1,2

Table 4.4 – Table représentant la réactivité des billes, calculée à partir des populations comptabilisées avec le cytomètre, selon la configuration de plug utilisé pour une capture en analyte supposée totale. Le taux de billes agrégées représente l'agrégation spécifique.

La réactivité des billes varie avec le nombre d'antigènes. Plus ce nombre est faible, plus la réactivité est importante (relation quasi linéaire). Si le nombre d'antigènes par bille est divisé par 10, la réactivité augmente de ce même facteur peu importe la quantité de billes initiale. Le nombre d'antigène par bille est le facteur déterminant.

De plus, on retrouve comme en volume une faible réactivité.

Influence du temps de percolation sur la concentration en analyte

Ce dispositif microfluidique, inspiré des colonnes chromatographiques de préconcentration, doit permettre de faire passer continuellement des échantillons pour augmenter la concentration en antigène dans le plug. En théorie, la concentration initiale n'est plus limitante. Seul le temps d'attente détermine la concentration minimale détectable. Trois temps de percolation d'échantillon sont testés. Nous nous focalisons sur la quantité de billes agrégées. Les résultats sont présentés figure 4.9.

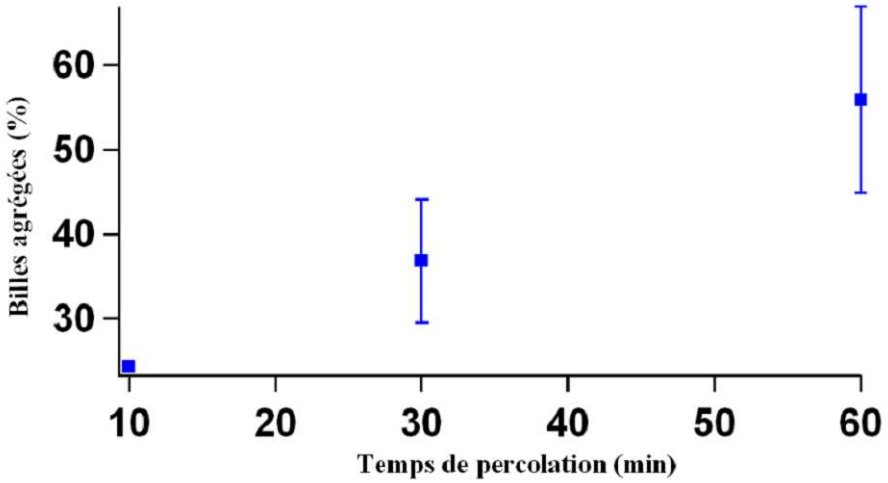


Figure 4.9 – Evolution du taux de billes agrégées en fonction du temps de percolation d'une solution de BSAb à 10 pM avec un débit de 1 nL/s. Expérience réalisée par D. Lefebvre de Rieux.

Le signal varie linéairement avec le temps de percolation (pente de 0,7). Cette pente (inférieure à 1) montre que la réactivité diminue avec le temps de percolation. Ceci est à relier avec l'augmentation du taux d'agglutination non spécifique sans doute dû à l'échauffement au niveau des pointes magnétiques. Ainsi, plus le temps est long, plus le nombre de billes libres baissent, diminuant la réactivité. La diminution de la reproductibilité des mesures (augmentation de l'écart-type) en fonction du temps de percolation est également une conséquence de l'augmentation du bruit.

Le système microfluidique augmente la réactivité des billes, concentre à souhait et capture quasi-totalement l'antigène. Les principaux objectifs établis au commencement du projet européen sont remplis. Reste à déterminer la concentration minimale détectable en un temps court.

4.3.2 La détection

Une courbe d'étalonnage est réalisée. Pour cela plusieurs concentrations en BSAb sont injectées. La quantité de billes agrégées est représentée en fonction de la concentration en BSAb (figure 4.10). Ces résultats sont obtenus sur trois jours.

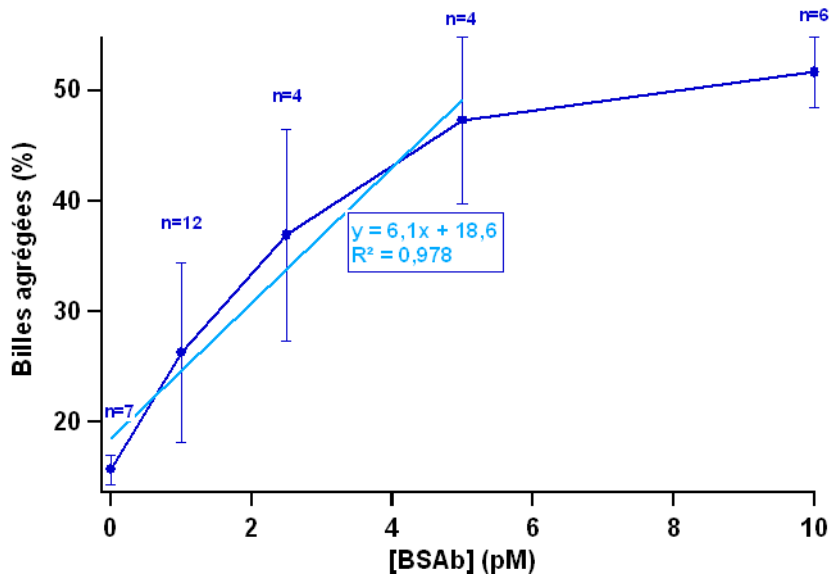


Figure 4.10 – Evolution du taux de billes agrégées en fonction de la concentration en BSAb après 12 min de percolation à 1 nL/s. n représente le nombre de mesures effectuées.

Première constatation, la valeur élevée du champ magnétique (supérieure à 100 mT) n'augmente pas le taux d'agrégation non spécifique (15,71 %) par rapport à celui obtenu en volume (15,98 %). Ce taux est reproductible ($\sigma = 1,31\%$ pour n=7). La formation d'agrégats varie linéairement avec la concentration en BSAb (pente de 6,1). La détection est très sensible aux faibles concentrations et sature rapidement vers 10 pM de BSAb. Ceci reflète la très faible réactivité des billes. Le seuil de détection établi une nouvelle fois vers 1 pM (3σ) - identique à celui

obtenu par l'EPFL avec une méthode de détection moins quantitative - confirme le problème de réactivité et non de détection.

Le signal obtenu avec ce nouveau mode de détection est très bruité (σ compris entre 7,5 % et 10 %). Plusieurs explications sont possibles :

- un mauvais contrôle des débits injectés entrainant une variation de concentration en BSAb
- une analyse non représentative (un tiers des billes est analysé)
- une mauvaise récupération des billes
- un échauffement au niveau du plug dû au champ magnétique appliqué et/ou à la lampe du microscope, favorisant l'agrégation au cours de la journée

Les performances de la puce de rétention sont reproductibles d'un système à un autre mais ne peuvent palier au problème de réactivité. La détection de la femtomole est impossible en 10 min.

Comparaison avec les résultats obtenus en volume

Afin d'évaluer l'impact du changement d'échelle fluidique sur les performances du test d'agglutination magnétique, les résultats obtenus sur le système microfluidique sont comparés à ceux obtenus en volume (présentés au chapitre III) sur la figure 4.11.

Le test microfluidique semble être plus sensible aux faibles concentrations que le test en volume mais également plus bruité. Grossièrement, l'allure des courbes et la limite de détection sont identiques pour ces deux formats fluidiques. Seul le temps d'analyse est changé. Le test est deux fois plus rapide en microfluidique en raison de l'absence d'étape d'incubation. Ceci nous amène à considérer plus en détails l'étape de préconcentration (pc).

20000 billes sont retenues dans le plug dont le volume est évalué à 1 nL. La concentration en billes est alors de 30 pM, ce qui est 300 fois plus élevé qu'en volume.

$$[Billes]_{plug} = \frac{N_{billes}.N_A}{V_{plug}}$$

En considérant une capture totale, nous faisons passer 720 nL ($12(min).1(nL/s)$)

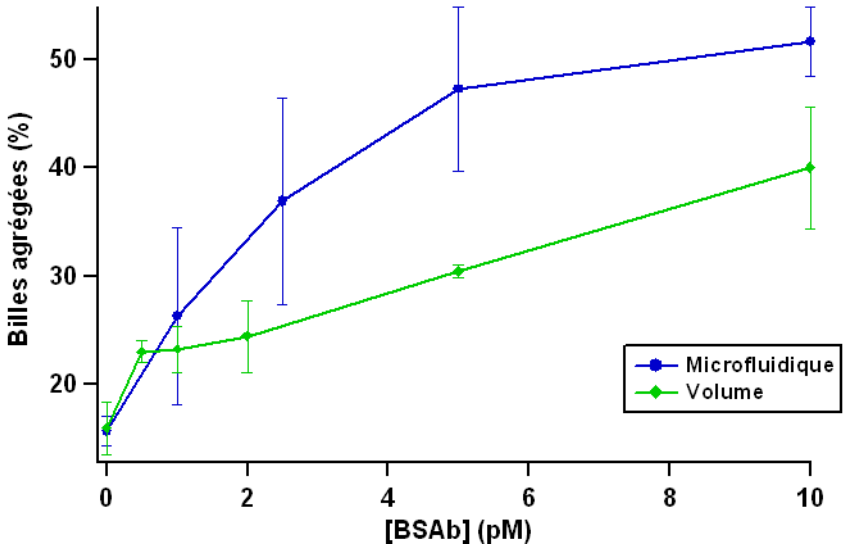


FIGURE 4.11 – Evolution du taux de billes agrégées en fonction de la concentration en BSAb en microfluidique (bleu) et en volume (vert)

d'échantillon à travers le plug de volume 1 nL, ce qui préconcentre 720 fois l'échantillon soit r=720. Ce facteur est très inférieur à celui estimé lors du premier dimensionnement (40 fois plus faible). Ceci s'explique par l'accent mis sur une capture totale au détriment d'un grand volume percolé.

Comparons maintenant le facteur de préconcentration ou plutôt le facteur d'enrichissement ($N_{antigene}/bille$) par rapport aux résultats obtenus en volume.

$$[echantillon]_{plug} = \frac{[echantillon]_{injecte}.V_{injecte}}{V_{plug}}$$

Application numérique :

$$[echantillon]_{plug} = \frac{[echantillon]_{injecte}.600}{1}$$

$$[echantillon]_{plug} = 720.[echantillon]_{injecte}$$

Ainsi la préconcentration finale du plug vaut (pc_{plug})

$$pc_{plug} = \frac{pc_{echantillon}}{pc_{bille}}$$

Application numérique :

$$pc_{plug} = \frac{720}{300}$$

$$pc_{plug} = 2,4$$

La quasi superposition des résultats obtenus en volume et en microfluidique s'explique par la valeur du facteur de préconcentration. En microfluidique, la concentration en antigène est très amplifiée (720 fois) mais également la concentration en billes (300 fois). L'efficacité de la préconcentration surtout avec des billes aussi peu réactives est assez faible aux concentrations testées. En revanche, ce système s'avère très intéressant aux très faibles concentrations d'antigènes où la thermodynamique peut être limitante.

Changement de configuration

L'agitation des billes pendant la percolation de l'échantillon limite la vitesse d'injection. Le débit maximal est de 1 nL/s. Au delà, les billes s'échappent du plug.

Un nouveau mode de "non agitation" de billes est testé afin d'augmenter les débits. Les billes sont laissées de part et d'autre du canal tout au long de l'expérience. Un faible champ magnétique alternatif est appliqué afin d'encourager la capture de l'antigène lors de sa percolation. Le débit maximal applicable est de 10 nL/s. Les solutions de BSAb sont injectées à ce débit pendant 5 min (figure 4.12).

Cette expérience montre que l'agitation des billes ne nuit pas grandement à l'efficacité de la capture. La sensibilité est conservée pour un temps deux fois plus court.

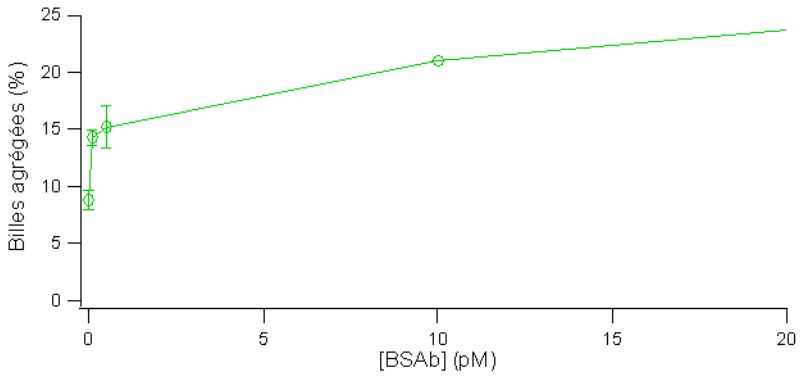


Figure 4.12 – Evolution du taux de billes agrégées en fonction de la concentration en BSAb après 5 min de percolation à 10 nL/s. Le nombre de billes dans le plug est de 40000.

4.4 Conclusion

Le système microfluidique développé par l'équipe de M. Gijs permet d'agiter des billes magnétiques en présence d'un flux. Il est reproductible, augmente la concentration en analyte dans le plug suivant le temps de percolation et capture quasi-totalement l'antigène. Il permet ainsi de franchir la barrière thermodynamique. La limite de détection atteinte révèle, quant à elle, le problème de la réactivité des billes mais également les faibles débits engagés qui ne permettent pas de concentrer suffisamment l'antigène dans le temps imparti. Le but fixé initialement, la détection de la femtomole en dix minutes n'est pas atteint.

Les premiers résultats obtenus sur le plug statique (débit "élevé") sont encourageants et montrent qu'un changement de la configuration du plug et un nouveau dimensionnement de la puce pourraient améliorer les performances actuelles.

Dans le cadre du programme DetectHIV, le système de préconcentration a été couplé à une détection cytométrique sur puce afin de réduire le bruit obtenu avec la mesure cytométrique "off-chip". Ce travail a été réalisé parallèlement aux travaux présentés dans le présent chapitre. Ce deuxième système microfluidique a été imaginé et fabriqué à la Technical University of Danemark (DTU) par l'équipe de J. P. Kutter.

Ces deux systèmes microfluidiques appelés puces microfluidiques, développés de manière indépendante au sein du réseau européen, ont ensuite été intégrés par Bertin Technologies. Ce travail, dans lequel j'ai pris part, est décrit dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Elaboration d'un test de diagnostic

Dans cette partie, le système microfluidique développé par Y. Moser situé à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) (figure 5.1) va être couplé à une détection cytométrique sur puce, fabriquée par T. Glasdam et G. Zhuang, travaillant à l'Université Technique du Danemark (DTU) (figure 5.2).

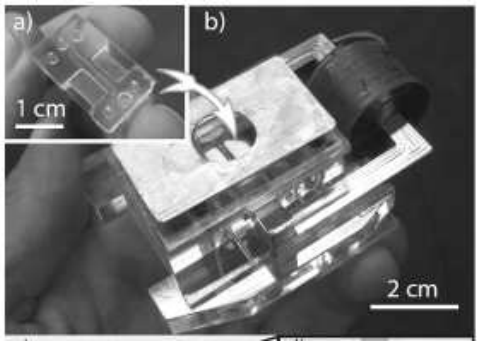
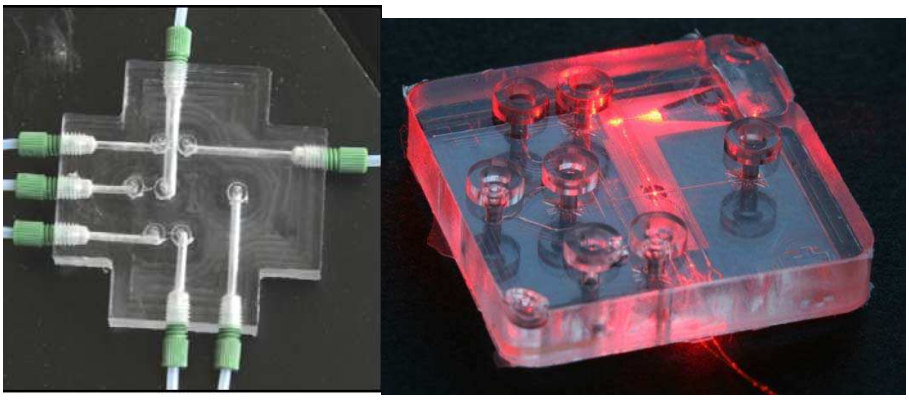


Figure 5.1 – Photo de la puce microfluidique de rétention. a) puce microfluidique. b) Support de la puce permettant son fonctionnement

Ce travail d'intégration est le résultat d'une forte collaboration entre les partenaires universitaires et Bertin Technologies. Il est guidé par le dimensionnement des briques technologiques réalisé en amont du programme et débute en même temps que la conception et la mise au point des systèmes microfluidiques.

Avant de procéder à l'intégration de ces deux systèmes, Bertin a établi un cahier des charges en accord avec les partenaires. Les principales fonctions du



(a) Aspect fluidique **(b)** Aspect optique

Figure 5.2 – Photo de la puce microfluidique de détection optique à intégrer.

démonstrateur sont présentées table 5.1.

Fonctions du démonstrateur
Contenir les liquides et l'échantillon
Véhiculer les liquides et l'échantillon
Concentrer les réactifs (bille et échantillon)
Détecter les réactifs
Commander le protocole (actionnement du protocole et acquisition)

Table 5.1 – Principales fonctions du démonstrateur

Le démonstrateur doit également répondre à des contraintes liées à l'utilisateur (simplicité), à l'extérieur (température, chocs ...)... Toutes ces spécifications sont prises en compte pour le dimensionnement final du démonstrateur et guide l'intégration des puces.

Pendant la première année du projet, ces deux systèmes ont fait l'objet de recherches poussées afin de répondre au dimensionnement initial, de mieux délimiter leur évolution sur les prochains mois et de faire fonctionner chacune des parties séparément. Une fois que la technologie mise en place par les deux partenaires - l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) pour la partie rétention et

l'Université Technique du Danemark (DTU) pour la partie détection - a été jugée assez mature un réel travail d'intégration a commencé concernant le choix des matériaux, du protocole de fabrication, du schéma microfluidique de la puce, et de la stratégie d'intégration.

5.1 Choix des matériaux et du protocole de fabrication de la puce intégrée

Les deux systèmes microfluidiques du projet (partie rétention magnétique et partie détection optique) ont été développés séparément respectivement par EPFL et DTU. Les matériaux utilisés diffèrent ; la partie rétention magnétique est composée de verre et de PDMS (polydimethylsiloxane) ; la partie détection optique ajoute à ces matériaux une résine photosensible,le SU-8. Une technologie commune a été adoptée, guidée par Bertin Technologies afin de n'avoir qu'une seule puce à intégrer au démonstrateur (toutes les fonctions sur la même puce).

5.1.1 Choix de matériaux

Système de rétention magnétique

Ce système est composé d'un canal microfluidique de 100 μm sur 100 μm [59]. Au plus près de ce canal, des pointes magnétiques siègent pour retenir les billes magnétiques. Ainsi la puce microfluidique comprend une simple couche de PDMS fixée sur une lame de verre plate (figure 5.3). Le microcanal et la partie permettant de guider l'insertion des pointes magnétiques sont fabriqués dans le PDMS en utilisant un protocole standard de moulage. Les pointes magnétiques sont découpées au laser et ont une largeur au niveau de la pointe de 100 μm. Les détails seront décrits plus loin. Le protocole de moulage du PDMS a été adapté à la puce intégrée.

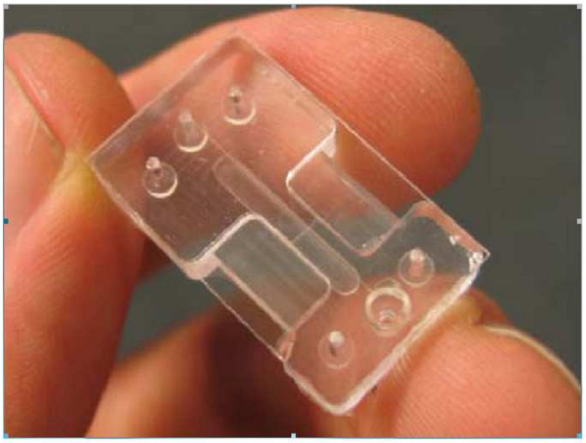


Figure 5.3 – Puce en PDMS collée sur du verre avec une partie rétrécie pour insérer les pointes magnétiques. Le microcanal mesure 100 μm sur 100 μm avec à ces extrémités des trous pour les connections fluidiques[59].

Système de détection optique

Cette partie allie une partie de manipulation de fluide et une partie purement optique constituée de guides d'onde pour la lumière incidente et diffusée après son passage à travers le canal fluidique à deux angles. Le « sandwich » PDMS/plaque de verre est également utilisé, comme pour la partie rétention magnétique, pour la création de canaux microfluidiques. A ce sandwich s'ajoute une résine photosensible négative, le SU-8 nécessaire pour la partie optique. Cette résine est réticulée selon les techniques standard de microfabrication - la photolithographie - et permet de diminuer la lumière parasite au niveau des guides d'onde de la lumière incidente grâce à une structure dite « structure de diffusion ». Cette structure consiste en une maille de 20 μm de large en forme « d'os de chien » améliorant ainsi le ratio signal sur bruit (figure 5.4). Le problème de la faible adhésion du SU-8 sur le verre est paré en utilisant une résine l'AP3000 appliquée sur le verre avant le SU-8. Les résultats obtenus par DTU avec cette technologie sont satisfaisants ; elle sera intégrée à la puce finale. Concernant la partie fluidique, la détection de particules de l'ordre du micromètre dans des canaux microfluidiques requiert une focalisation hydrodynamique à 3 dimensions afin de s'assurer du passage individuel des parti-

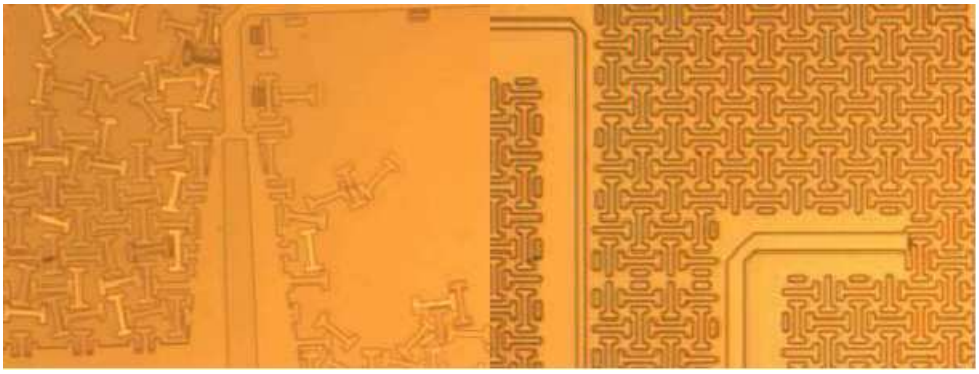


Figure 5.4 – Structures en SU-8 permettant la réduction de la lumière parasite au niveau de l'entrée du laser. A gauche, sans AP3000, à droite structure bien alignée avec AP3000.

cules devant le détecteur. Dans ce but, un système relativement sophistiqué a été conçu par DTU (figure5.5))

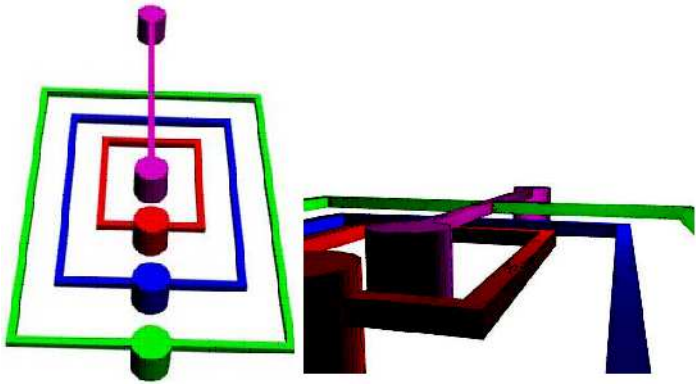


Figure 5.5 – Plan (schéma) fluidique de l'hydrofocalisation 3D de la puce. Les canaux bleu et rouge sont sous les canaux vert et violet. Le canal rouge contient l'échantillon, les autres du tampon.

Puce intégrée

Afin de faciliter l'intégration, les matériaux de la puce sont identiques pour les 2 parties, rétention magnétique et détection optique. La puce est une superposition de trois couches : PDMS, SU-8 et verre. Les canaux microfluidiques qui doivent

être réalisés sur 2 niveaux (figure5.5) se trouvent dans le PDMS et le SU-8 (figure 5.6). Une très bonne adhésion entre ces deux couches est nécessaire afin d'éviter tout risque de fuite. Le PDMS est donc pressé sur la couche de SU-8 jouant ainsi le rôle de joint d'étanchéité. Les arrivées fluidiques, via des tubes, sont connectées sur le support de la puce par contact direct et rapide, dans la couche de PDMS, assurant ainsi l'étanchéité du système. Les connecteurs sont en PEEK.

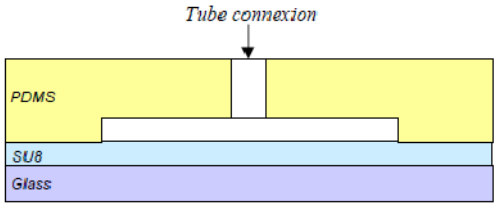


Figure 5.6 – Vue schématique du sandwich verre/SU-8/PDMS pour la puce intégrée. Les tubes sont insérés directement dans le PDMS pour les connections fluidiques.

5.1.2 Fabrication de la puce intégrée

Puce intégrée : cartouche jetable

Une technologie commune de fabrication a été définie par les deux partenaires EPFL et DTU. La puce finale est composée de verre/SU8/PDMS impliquant l'ajout de la résine SU8 entre le verre et le PDMS au niveau du système de rétention. Afin d'assurer une bonne étanchéité et faciliter l'insertion de la puce sur le support approprié du démonstrateur, deux plaques en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) vont maintenir ces trois couches (figure 5.7). Leur épaisseur est de 2 mm, suffisamment épaisse pour exercer la pression nécessaire sur la puce et assez fine pour permettre une observation au microscope. L'épaisseur du verre est standard - 500 μm - et celle du SU8 - 75 μm - est choisie légèrement plus grande que le diamètre des fibres optiques (65 μm) afin de faciliter leurs insertions et leurs connections. La couche de PDMS est de 3 mm pour améliorer sa manipulation et assurer l'étanchéité entre les différentes couches.

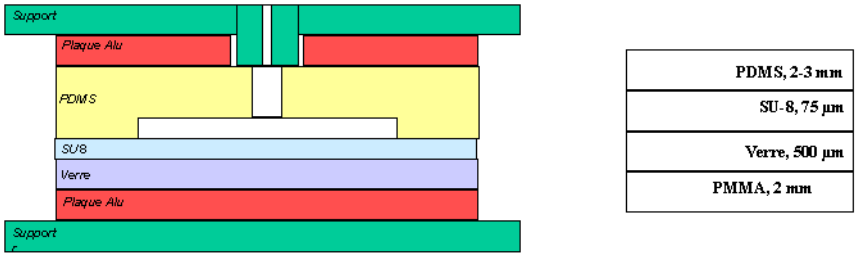


Figure 5.7 – Vue schématique du sandwich verre/SU-8/PDMS pour la puce intégrée. Les tubes sont mis directement en contact avec le PDMS pour les connections fluidiques.

Technologie de fabrication du moule pour le PDMS de la puce

Seul est détaillé le moule en PDMS car il résulte d'un réel travail d'intégration entre les différents partenaires ; la fabrication du SU-8 est quant à elle propre à la technologie mise en place par DTU suivant un protocole standard de photolithographie. Le PDMS est fabriqué à l'EPFL. Il est coulé dans un moule contenant un couvercle et un cadre en PMMA, un masque en silicone/SU8 positionné sur une plaque en silice et un socle en aluminium (figure 5.8). Les plaques d'aluminium compressent le sandwich PDMS/SU8/Verre afin d'éviter toutes fuites. Grâce à cette méthode, les puces sont fabriquées de manière reproductible.

La figure 5.9 représente le moule du PDMS. Il comprend 2 réservoirs, 6 entrées, 1 sortie et 3 accès pour les vérins. Le détail de cet agencement sera expliqué plus loin. Deux enfoncements sont utilisés pour faciliter l'incorporation des pointes magnétiques. Quand le PDMS est injecté dans le moule, une sortie d'air permet d'enlever les éventuelles bulles d'air injectées avant la réticulation du PDMS.

Résultats

La fabrication de puce à partir de ce moule est reproductible mais prend énormément de temps en raison de sa complexité, principalement due aux nombreuses entrées fluidiques. Leur nombre est conditionné par le fonctionnement de la puce défini ci-dessous.

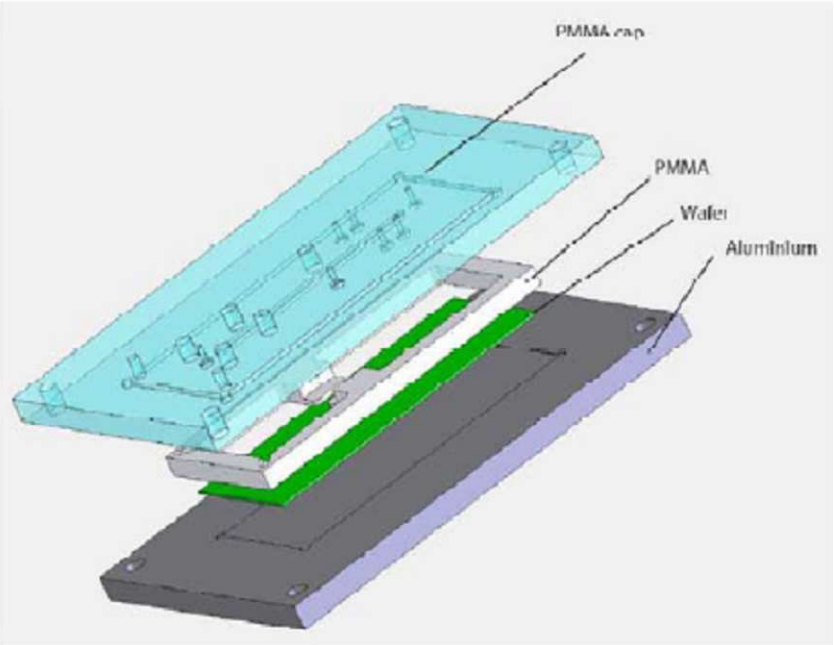


Figure 5.8 – Vue schématique en 3D du moule pour la fabrication de la puce intégrée.

5.2 Définition de la puce intégrée

5.2.1 Enjeu de l'intégration : manipulation fluidique

L'obstacle majeur de l'intégration des systèmes de rétention magnétique et de détection optique, est leur différence de fonctionnement fluidique. D'un côté, la partie rétention fonctionne en aspiration pour faciliter l'insertion de l'échantillon via une pipette en minimisant la création de bulles d'air et d'un autre côté, la partie détection optique travaille en pression car elle utilise un système d'hydrofocalisation 3D où les solutions sont poussées à travers les canaux. DTU a essayé de changer cette configuration fluidique sans grand succès en raison de la formation de bulles d'air engendrée par l'aspiration des liquides depuis la sortie de la puce. Selon DTU, travailler en aspiration, nécessiterait une longue période de mise au point. Les partenaires ont donc décidé de conserver leurs modes de fonctionnement, aspiration et pression, pour la puce intégrée.

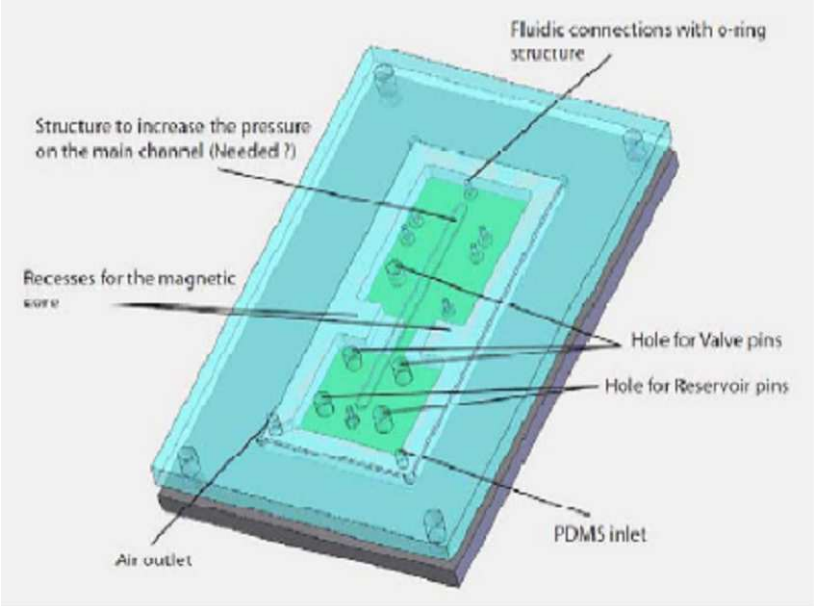


Figure 5.9 – Significations des différentes parties du moule pour le PDMS de la puce finale.

5.2.2 Dimensionnement de la puce

Microcanaux

Pour la partie rétention magnétique, la hauteur des canaux est principalement déterminée par l'épaisseur des pointes magnétiques (100 μm). Pour des raisons de symétrie, des canaux carrés de 100 μm ont été choisis. Cette dimension est appliquée jusqu'à la jonction des deux systèmes microfluidiques. Les pointes sont positionnées au plus près du canal car des simulations numériques ont montré que la force magnétique était plus élevée aux faibles distances. Ainsi la distance choisie entre la pointe et le canal est de 50 μm ; distance la plus faible permettant de réduire le risque de percer le canal lors de l'insertion des pointes. Pour la partie de détection optique, la largeur du canal principal (canal passant devant le détecteur) est de 500 μm pour une hauteur de 75 μm. Les canaux servant à l'hydrofocalisation 3D ont quant à eux une largeur de 50 μm. La longueur des différents canaux est conditionnée par l'encombrement des composants externes à la puce tels que les

vérins, les connecteurs ...

Taille des réservoirs

Deux réservoirs d'entrée - un réservoir pour les billes et un réservoir pour l'échantillon - sont incorporés dans le PDMS et ont un volume d'environ $30\mu L$. Ils sont plus grands que le volume nécessaire afin de :

- faciliter l'accès à la pipette
- manipuler avec précision les volumes (un volume inférieur à $10\mu L$ est difficile à manipuler)

Pour la poubelle de sortie, aucun réservoir n'a été prévu dans le PDMS. La sortie est directement connectée à une poubelle extérieure via un tube souple.

Structure en serpentin

Afin d'éviter tout risque de contamination des parties permanentes du démonstrateur telles que les connecteurs fluidiques, les tubes, les seringues...une structure en serpentin est ajoutée sur la puce à deux endroits critiques. La contamination est principalement due à la diffusion de la protéine p24 à travers les canaux microfluidiques (mouvement brownien). Cette vitesse de diffusion est déterminée par un coefficient de diffusion D :

$$D = \frac{kT}{6.\pi.\eta.R_h}$$

avec, k : constante de Boltzmann ; $1,38.10^{-23} J.K^{-1}$, T : température en Kelvin, η : viscosité dynamique ; $1,3.10^{-3} kg.m^{-1}.s^{-1}$ pour le plasma sanguin à 310 K, R_h : rayon hydrodynamique ; 5,3 nm pour le p24.

Application numérique(AN) : D=$3,3.10^{-11} m^2.s^{-1}$

D'après ces estimations, on peut en conclure que pour un test de 15 min, la protéine p24 diffuse dans un échantillon plasmatique sur une longueur de 720 μm. La structure en serpentin présente sur la puce a une longueur supérieure à 100 mm, ce qui assure la non contamination des parties fixes du démonstrateur par la

protéine p24.

Vérin

Afin de permettre la succession des modes fluidiques - aspiration pour la partie rétention et pression pour la partie détection - des emplacements destinés à l'usage de vérins ont été prévus. Ces vérins permettent d'obturer les canaux et de contrôler le sens du flux dans la puce intégrée. Bertin Technologies a développé et mis en oeuvre des vérins sur la puce par pincement du PDMS (figure 5.10). Ces vérins, actionnées par un moteur électrique, compressent la membrane de PDMS afin de fermer le canal microfluidique. DTU avait précédemment fabriqué un prototype de valve pour valider ce système de fermeture de canal en décembre 2008. Cette valve a été testée avec succès lors de la première intégration à DTU (tests avec les puces individuelles magnétique et optique). Le dimensionnement de la puce étant

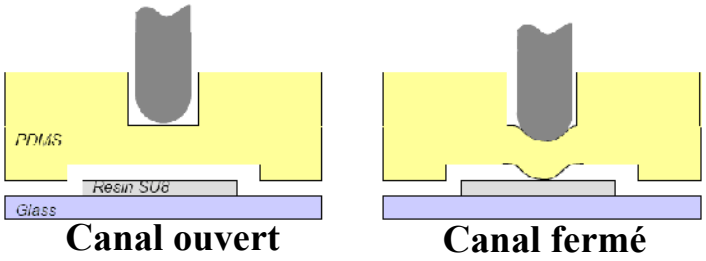


Figure 5.10 – Principe de fonctionnement des vérins sur la membrane du PDMS pour ouvrir ou fermer le canal microfluidique.

acquis, les plans de fabrication sont à établir.

5.2.3 Conception/Plan/Schéma

En accord avec les précédentes considérations, une conception fluidique basée sur l'alternance des modes aspiration/pression est élaborée. Les deux modules, rétention magnétique et détection optique, sont intégrés sans problème majeur. En décembre 2008, un schéma de la puce intégrée a été défini lors d'une réunion à DTU. La partie rouge correspond à la partie optique en SU8. La partie verte au

PDMS comprenant la partie rétention et les canaux supplémentaires pour l'hydrofocalisation 3D. La partie magnétique et les vérins sont en bleu. Les pointes magnétiques sont séparées de 200 μm (100 μm pour le canal et $2 \times 50 \mu m$ entre le canal et la pointe). Le changement entre les deux modes fluidiques se fait grâce à l'activation des vérins sur puce. Les structures en serpentins, agissant comme une barrière de diffusion, ont été incorporées au schéma fluidique de la puce afin de minimiser les risques de contamination des éléments permanents du démonstrateur. Les deux réservoirs en PDMS sont utilisés pour insérer les solutions de billes et l'échantillon (figure 5.11 et figure 5.12).

Les billes et l'échantillon sont introduits à l'entrée au niveau des réservoirs de la puce.

Le fonctionnement séquentiel du système est prévu de la façon suivante. Les billes sont aspirées en présence d'un champ magnétique afin d'être retenues au niveau des pointes magnétiques : ce volume de billes "bloqué" au travers du canal est appelé plug. Ensuite c'est au tour de l'échantillon de traverser le plug. Puis les billes magnétiques sont relâchées, laissées quelques minutes dans le canal pour permettre la formation d'agrégats et poussées vers la partie de détection optique à l'aide d'une seringue supplémentaire.

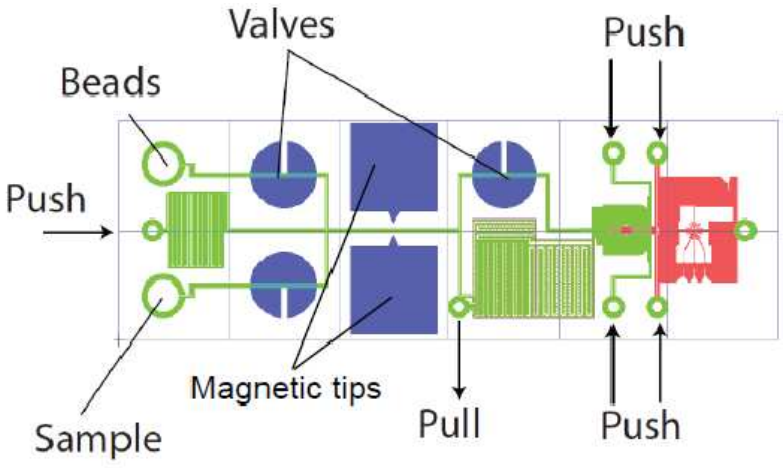


Figure 5.11 – Vue schématique de la puce intégrée. Vert : couche de PDMS, rouge : couche de SU8, bleu : valves et pôles magnétiques.

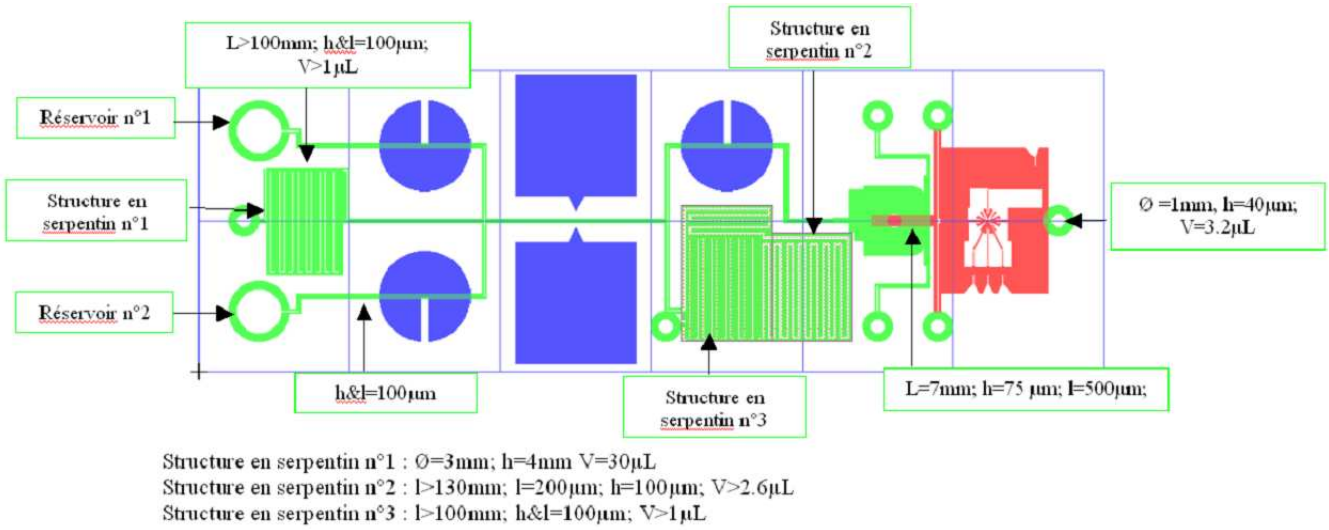


Figure 5.12 – Vue schématique de la puce intégrée avec les dimensions.

Place maintenant à la fabrication.

5.2.4 Résultat de l'intégration : la puce unique

Présentation

Une étroite collaboration entre l'EPFL, DTU et Bertin Technologies a permis de fabriquer une puce microfluidique unique. Cette puce respecte le protocole de fonctionnement de chacune des parties intégrées. Le PDMS est fabriqué par l'EPFL, Bertin fait usiné les plaques de PMMA pour maintenir la puce et faciliter son insertion. DTU fabrique le PDMS, assemble les différentes couches de la puce finale (PDMS/SU8/verre) et insère les pointes magnétiques, la lentille et les fibres optiques (figure 5.13).

Résultats

Le premier point vérifié est l'étanchéité aux plus forts débits. Ce test est réalisé avec un colorant alimentaire afin de visualiser le trajet du liquide tout en évitant



Figure 5.13 – Puce microfluidique intégrée avec les 2 pointes magnétiques et les 2 fibres optiques, comprise entre les 2 plaques de PMMA.

la présence de cristaux et/ou de résidus dans les canaux microfluidiques. Aucune fuite n'est visualisée. Le fonctionnement fluidique de la puce est validé, il faut maintenant concevoir le démonstrateur adapté à cette puce.

5.3 Stratégie pour l'intégration

La puce finale a été conçue pour permettre son bon fonctionnement dans le système afin de détecter la protéine p24 avec une grande sensibilité. En parallèle de la validation du fonctionnement fluidique de la puce, la conception du démonstrateur a été conduite pour que l'équipement s'adapte au mieux à la puce.

5.3.1 Thermalisation

Concept

Au cours du projet européen, Ademtech a démontré à l'aide d'une expérience de Western Blot que la reconnaissance spécifique entre la protéine p24 et l'anticorps polyclonal de mouton anti-p24 d'Aalto Bio Reagent est accélérée à 37°C. Afin de diminuer le temps d'expérience, la température à l'intérieur du démonstrateur est fixée à 37°C. Bertin Technologies a mis en place une régulation thermique autour

du support de la puce. Le système retenu est un système pulsant de l'air chaud en continu, délivré par des modules en céramique (figure 5.14). Ainsi, l'enceinte du démonstrateur est à 37°C et par convection/conduction thermique la puce également. La régulation est automatisée par le logiciel Labview avec l'aide d'une thermistance placée au contact du PDMS de la puce. La température de régulation fonctionne ainsi : si la température est supérieure à 38°C, le chauffage est arrêté et si la température est inférieure à 36°C, le chauffage est allumé. Après quelques calculs, le flux d'air doit être compris entre 80 et 90 m^3/h avec une puissance de 500 W pour un volume de 0,075 m^3. Seules trois plaques en céramique sont finalement néces-

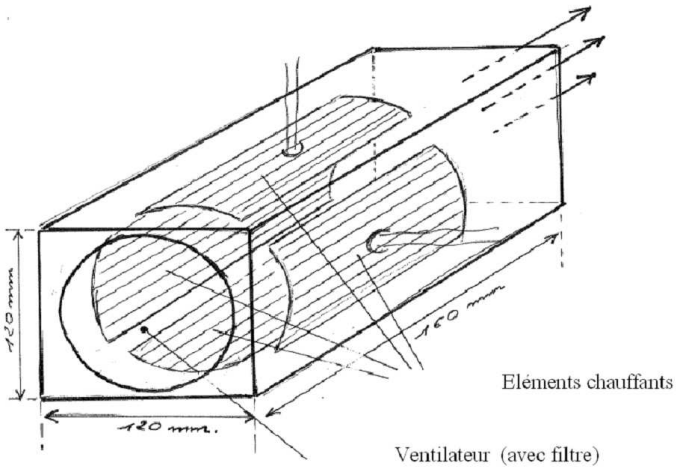


Figure 5.14 – Principe de la régulation thermique

saires pour cette régulation. La température de 37°C est atteinte dans l'enceinte du démonstrateur en 30 min (figure5.15). Une fois cette température enregistrée, la régulation se fait avec une amplitude de 1°C. Entre deux tests c'est-à-dire entre deux positionnements de puce, l'enceinte est ouverte et le retour à 37°C nécessite une trentaine de secondes avec une température extérieure (de la pièce) de 22°C. Ce montage thermalise rapidement l'enceinte du démonstrateur. Un déflecteur a été rajouté à la sortie du système de régulation thermique afin de diminuer le bruit lors de la mesure du signal optique engendré par l'air pulsé faisant bouger les fibres optiques. Un temps d'équilibre du laser est nécessaire après la montée en température, augmentant ainsi le temps d'attente avant la première utilisation

journalière du démonstrateur.

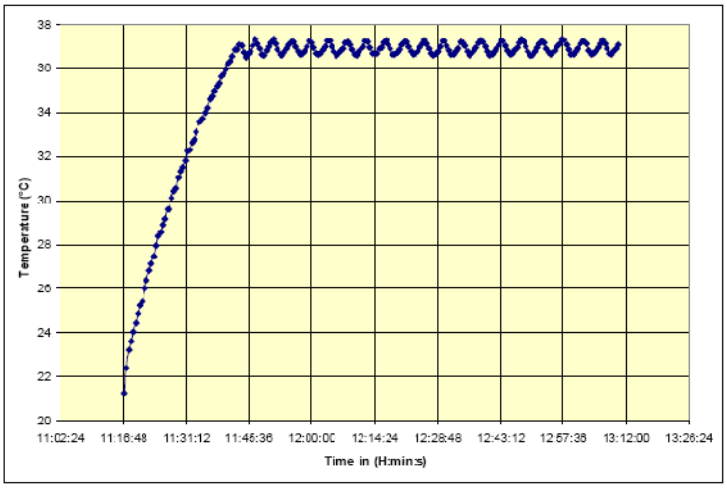


Figure 5.15 – Courbe de régulation en température du démonstrateur via le logiciel développé par Bertin sur Labview.

5.3.2 Calibration du protocole

Le protocole global (magnétique et fluidique) doit être maintenant en accord avec les précédentes valeurs et le fonctionnement de chaque sous système.

Protocole fluidique

Général

Les billes (position 1) sont aspirées au niveau de la partie magnétique (entre les pointes position D) via le pousse seringue en 2 (figure5.16). Le vérin A est en position basse, il ferme le canal, les vérins B et C sont en position haute. Les billes sont mélangées par agitation magnétique et l'échantillon (3) est aspiré à travers le plug. L'échantillon est stocké dans la structure en serpentin (4) après son passage à travers le plug. Le vérin A est en position haute (canal ouvert) ; les vérins B et C sont en position basse. Le relargage du plug magnétique est fait par un pousse seringue supplémentaire en mode pression (5) et passe dans la partie de détection.

L'échantillon est focalisé verticalement avec les flux 6 et 7, puis horizontalement formant avec le flux 8 une section efficace rectangulaire. Une poubelle est connectée en 9 pour collecter les liquides. Pour prévenir les risques de contamination entre

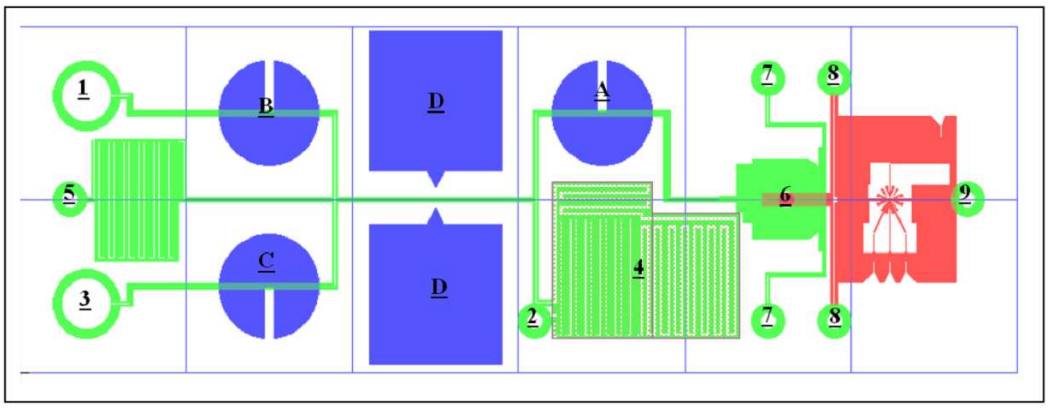


Figure 5.16 – Vue schématique de la puce intégrée. Vert : couche de PDMS, rouge : couche de SU8, bleu : valves et pôles magnétiques.

deux tests c'est-à-dire entre deux puces différentes, des structures en serpentin ont été ajoutées sur la puce. Ces structures sont placées au niveau des connections avec le pousse seringue travaillant de manière séquentielle en pression (5) et en aspiration (2). Le serpentin 4 peut contenir tout l'échantillon passé à travers la puce et ainsi éviter toute contamination de la seringue (2) en mode aspiration.

Synoptique

Le protocole fluidique est détaillé ci-dessous (figure 5.17). B et E représentent respectivement les billes et l'échantillon.

5.3.3 Protocole magnétique

Tous les paramètres magnétiques du protocole ont été définis par l'EPFL. Le relargage progressif du plug est un paramètre important. Il conditionne la qualité de la détection des agrégats et doit être en accord avec la fréquence de détection du système de détection optique développé par DTU. Le nombre d'objets pouvant être comptés par seconde détermine donc la relâche du plug ainsi que la durée totale

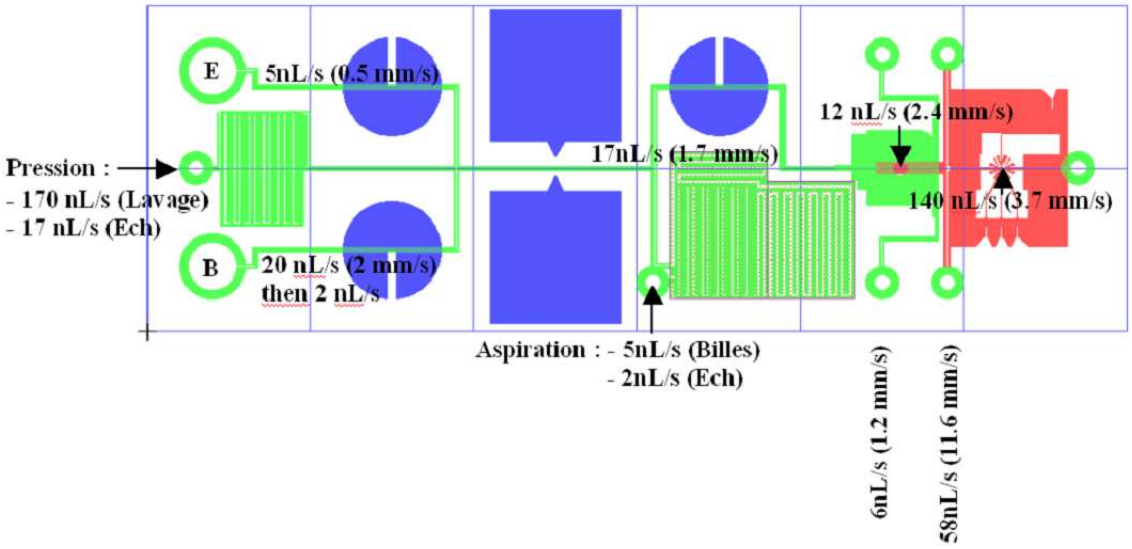


Figure 5.17 – Protocole fluidique avec la valeur des débits pour les différentes parties.

Contraintes	Données d'entrée
Fréquence de détection: 500 Hz	Nombre de billes: 51 200
	Flux dans la partie détection après la focalisation 3D: 140 nL/s
	Flux de l'échantillon avant la focalisation 3D: 17 nL/s

Figure 5.18

du test. La fréquence limite de détection a été établie par DTU à 500 objects par seconde. Ce qui correspond à un relargage des billes sur une longueur de 51 mm au vue des données d'entrées listées figure 5.18.

Etant donné que la partie optique n'a pas permis de détecter les billes, le paramètre de relargage n'a pas été optimisé.

Composants fluidiques

Seringues

Le choix des seringues doit être adapté au flux et au volume dispensé pour chaque test (V.3.2. synoptique).

Partie magnétique

La formation du plug requiert un débit très faible et controlé. L'utilisation de seringue en verre de petit volume est recommandée afin d'éviter la déformation des parois et de contrôler au mieux ce débit. D'après le protocole fourni par l'EPFL, 200 nL d'échantillon sont aspirés à travers le plug, au maximum ce volume peut être de 1 μL. L'utilisation d'une seringue de 50 μL est choisie (volume 40 fois supérieur à celui utilisé lors d'un test).

Résultats

Les résultats sont satisfaisants. Cette seringue couplé au pousse seringue permet de contrôler le flux à travers le plug magnétique sans arracher les billes.

Partie optique

Pour cette partie, les débits sont rapides et donc non critiques. Le choix des seringues est conditionné par la facilité de manipulation c'est-à-dire l'exécution d'un maximum d'essais sans remplir les seringues. Les seringues utilisées sont en plastique. Au début de l'expérience, toutes les seringues sont utilisées pour éliminer

	Débits (nL/s)	**Temps (s)**	**Volume (μL)**
Echantillon	17	600	10,2
1^{ere} hydrofocalisation	12	600	7
2^{eme} hydrofocalisation	6	600	3,5
3^{eme} hydrofocalisation	58	600	34,8

les bulles d'air dans le circuit microfluidique. Le temps de cette étape est estimé à environ 5 min et tous les flux sont 10 fois plus rapides que ceux du protocole.

Au minimum, les seringues peuvent effectuer plusieurs expériences avant d'être remplies.

Pousse seringue

	Volume utilisé pour éliminer les bulles (µL)	Volume utilisé pour l'analyse (µL)	Volume de seringue choisi (µL)	Nombre de tests / seringue
Echantillon	51.0	10.2	10000	160
1er hydrofocalisation	36	7	1000	45
2ème hydrofocalisation	18	3.5	1000	45
3ème hydrofocalisation	174	34.8	10000	50

Figure 5.19 – Tableau répertoriant les volumes dispensés par toutes les seringues au cours d'une analyse.

Le contrôle des fluides est primordial. Grâce à un contrôle efficace, la quantité de billes injectées, de sang et de tampon sont parfaitement connues, permettant ainsi une bonne sensibilité. La stabilité des débits est également un paramètre important. En effet, la présence de pulsations dues à la présence de bulles d'air ou du fonctionnement des pousses seringues, peut générer une perte de billes au niveau du plug (en raison de l'accélération du flux) et/ou masquer des objets devant le détecteur. Les 2 partenaires DTU et EPFL utilisent différents pousses seringues (Harvard et neMESYS) par habitude. Ces 2 appareils sont coûteux, un autre pousse seringue a été testé pour savoir s'il répondait aux exigences de chacun des sous systèmes, il s'agit du pousse seringue Aladdin de WPI.

Vérification théorique

Avec les spécifications du pousse seringue Aladdin, les débits maximal et minimal du moteur sont respectivement de 180 cm/h et 0,03 cm/h. Dans un premier temps, nous pouvons vérifier, avec ces données, si l'utilisation de ce pousse seringue convient en théorie (tableau 5.20). Lors de la procédure, les pousses seringues seront utilisés dans leur gamme basse de fonctionnement. Pour vérifier leur précision, nous avons décidé de le tester avec la vitesse de moteur la plus faible du protocole c'est-à-dire 0.172 cm/h.

Vérification expérimentale

Avant intégration :

Lors du premier test d'intégration, ayant eu lieu à DTU en décembre 2008, le pousse seringue Aladdin a été utilisé pour la partie rétention magnétique car la

	Volume de la seringue (mL)	Diamètre interne (mm)	Débit (nL/s)	Vitesse du moteur (cm/h)	Comparaison avec la gamme Aladdin (%)
Formation du plug	0.05	2	1.5	0.172	0.09
Trajet de l'échantillon à travers le plug	0.05	2	5	0.573	0.32
Trajet de l'échantillon à travers la détection optique	10	15.3	17	0.332	0.18
1er hydrofocalisation	1	4.93	6	0.113	0.06
2ème hydrofocalisation	1	4.93	6	0.113	0.06
3ème hydrofocalisation	10	15.3	58	0.113	0.06

Figure 5.20 – Vérification théorique de la bonne gamme d'utilisation des pousses seringues.

présence de pulsation lors de cette étape est très critique contrairement au système de détection optique. Les billes sont aspirées de manière uniforme et le passage de liquide à 1 nL/s à travers le plug n'arrache pas les billes ; démontrant ainsi une certaine régularité du débit délivré par l'appareil. Les résultats sont satisfaisants et validés en comparaison avec la personne manipulant habituellement le système de rétention utilisant un pousse seringue plus précis. Le pousse seringue Aladdin, a donc réussi le test qualitatif (appréciation visuelle de la tenue du plug par Yves Moser [59]) ayant développée le système de rétention de l'EPFL) et est retenu pour l'intégration du démonstrateur.

Après intégration :

Deux pousses seringues supportant chacun une seringue et un pousse seringue permettant le contrôle simultané de six seringues (pour la partie focalisation) sont intégrés et pilotés par Labview. Les premiers essais fluidiques ont portés sur la validation des débits du pousse seringue aux 6 seringues (figure 5.21). En raison des faibles débits utilisés - 12nL/s ; 6 nL/s ; 58nL/s - une mesure globale du débit (somme de tous les débits des six seringues) a été vérifiée en pesant le liquide en sortie sur une balance de grande précision. L'écart avec la valeur théorique diminue

Débit devant le laser (µL/min)	Ecart avec la valeur théorique (%)	Ecart type (%)	Nombre d'expérience
27	-8.36	10.4	9
13	-10.8	10.2	6
8.2	-11.6	9.4	5

Figure 5.21 – Etude de la précision des débits délivrés par le pousse seringue Aladdin supportant 6 seringues pour la partie d'hydrofocalisation.

lorsque les débits augmentent. En revanche la répétabilité des valeurs est toujours aussi dispersée. Les premiers essais sont réalisés avec ces pousses seringues. Devant l'impossibilité de détecter des billes magnétiques de diamètre 3 μm en utilisant ces pousse seringues et au vu de toutes ces valeurs critiques, de nouveaux pousses seringues - Harvard - plus précis ont été utilisés. Un pousse seringue est utilisé pour faire passer les billes du plug devant le laser de la partie détection (position 5 sur le figure 5.16), un autre regroupe les quatre seringues de volume 1 mL du système d'hydrofocalisation et un dernier pour les deux seringues de 10 mL. Ces pousses seringues ne sont pas pilotés par Labview, les valeurs de débits sont définis manuellement. La suite des essais est réalisée avec cette nouvelle configuration fluidique.

Vérin

Présentation

Afin de permettre l'alternance des modes de pression et d'aspiration du protocole fluidique, des endroits spécifiques ont été prévus sur le chemin fluidique pour positionner les vérins. Ces vérins permettent de fermer le canal microfluidique en comprimant la couche de PDMS. Les manipulations fluidiques sont ainsi contrôlées durant un essai. Bertin a développé et mis en oeuvre ces valves à pincement.

DTU a fabriqué un prototype de valve afin de valider le plus tôt possible ce principe de fermeture des canaux via le pincement du PDMS. Cette valve a parfaitement fonctionné durant l'intégration complète en décembre 2008 (test avec les

puces magnétique et optique séparées). En 24 secondes, le canal de $200 \times 200\mu m$ est fermé et est ouvert en 23 secondes. Cette action nécessite d'aspirer légèrement le liquide avant la fermeture afin de ne pas détacher les billes créant le plug en raison de la quantité de liquide déplacée dans le canal.

Les activateurs utilisés pour ces trois "valves sur puce" sont des activateurs linéaires électriques de grande précision. Ils permettent de fermer le canal de manière douce. Ils sont contrôlés par asservissement de position.

Résultats

Les premiers tests ont porté sur la calibration du déplacement des vérins. Le déplacement nécessaire pour fermer le canal de la puce a été calculé pour chacun des vérins suivant leur position initiale (une fois fixé au support de la puce) (figure5.22).

N° Vérin	Distance avec la plaque supportant les connections fluidiques (mm)	Déplacement nécessaire pour fermer le canal de la puce (mm)
1	3.3	3.7
2	4.7	2.3
3	3.2	3.8

Figure 5.22 – Positionnement initial des vérins une fois fixé au support et déplacement requis pour obturer les canaux microfluidiques.

Le déplacement des trois vérins est très reproductible et présente un faible écart-type aux faibles déplacements. L'écart type de déplacement pour une valeur est anodin par rapport à la distance parcourue. La fermeture du canal microfluidique est validée visuellement avec l'utilisation d'une solution colorante. Si la solution passe de l'autre côté du point de contact entre le vérin et le PDMS, le canal est ouvert, sinon il est fermé. L'expérience montre que le vérin permet de fermer le canal sans le détériorer. Il est arrivé quelques fois, qu'après la fermeture du canal, une fuite au niveau de la connection entre le pousse seringue 1 et la puce apparaisse. Ceci peut être éliminée en agrandissant la plaque de PMMA (couvercle de la puce) afin d'avoir une plus grande surface de pression à cet endroit.

Electrovalve ou valve solénoïde

Les pousses seringues délivrent le bon débit mais lorsqu'ils sont arrêtés un débit persiste quelques secondes. Afin de remédier à ce phénomène, chaque seringue positionnée sur les pousses seringues est équipée d'une électrovalve trois voies pour arrêter ce flux inertiel dans les tubes et permettre leurs remplissages automatiques. Ces electovalves sont parfaitement pilotées par Labview. Aucun déplacement de liquide ne se produit lors du changement de voie. Il est à noter que ces electrovalves possèdent deux positions : une position dite de repos et une position dite de travail. Dans notre cas, il s'agit du chemin seringue/réservoir de liquide. D'autre part, l'utilisation de ces valves favorisent la présence de bulles d'air, un travail manuel de purge journalier est nécessaire.

Connections fluidiques

Principe

Les connections fluidiques entre le démonstrateur et la puce doivent être étanches d'une puce à une autre et éviter l'infiltration d'air pouvant générer des bulles dans le système. Une forme particulière au niveau de la connectique permet d'assurer l'étanchéité.

Résultats

Les connections fluidiques sont étanches et ne semblent pas favoriser la présence de bulles d'air dans le circuit. La désinstallation et l'installation d'une même puce, après évacuation des bulles d'air lors de la première installation, ne crée pas de nouvelles pertes de charge.

5.3.4 Partie optique

Présentation

La partie optique est un cytomètre intégré sur une puce (figure 5.23). Cette puce comporte 1 entrée fluidique pour l'échantillon et 6 entrées pour les fluides afin de focaliser les billes devant le détecteur et procéder à la lecture individuelle. Ce système remplace le liquide de gaine du cytomètre. Un laser illumine très localement sur le canal microfluidique (fuselage entre 30 et 60 μm par une lentille

elliptique). La lumière diffusée par les billes est recueillie à deux angles différents par des guides d'onde sur la puce et des fibres optiques hors de la puce, connectées chacune à un PMT. Le montage tel qu'il est chez notre partenaire DTU est montré figure 5.24. La partie optique est donc composée d'une partie fluidique (détaillée

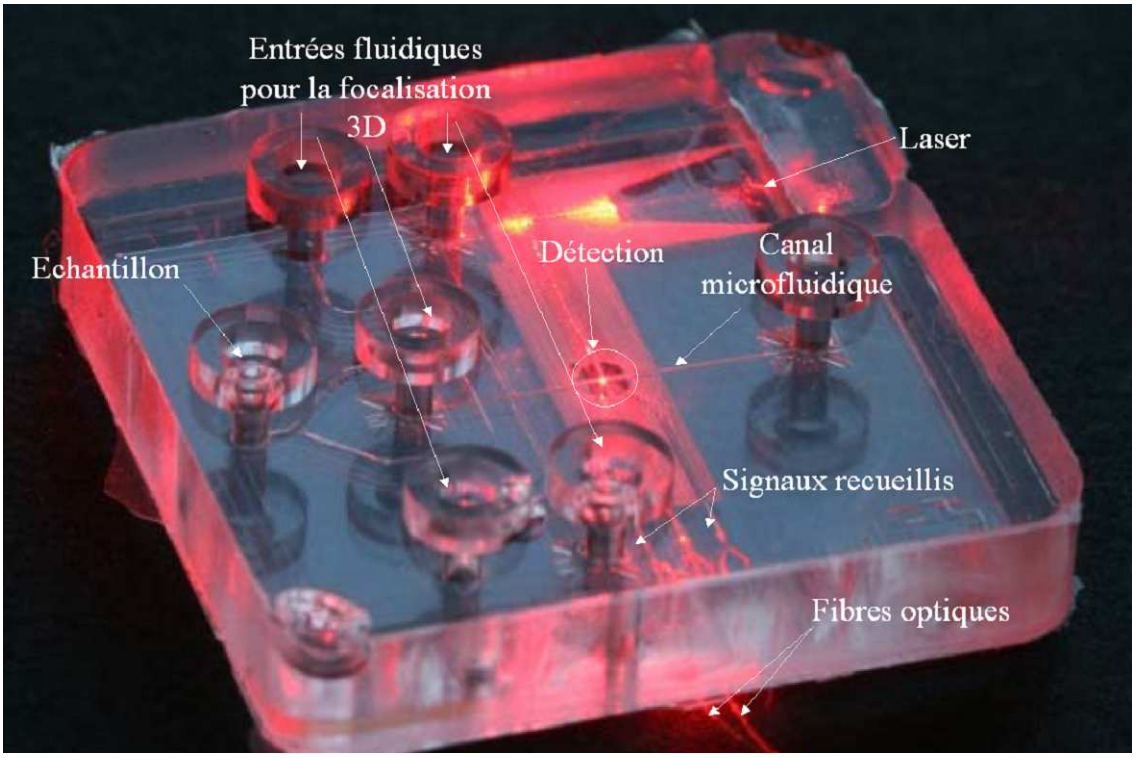


Figure 5.23 – Puce de détection optique développée par DTU.

précédemment) et d'une partie optique intégrée au démonstrateur. Cette dernière partie comprend un système en amont de la puce pour focaliser la lumière incidente via un laser et une lentille et un système en aval pour recueillir la lumière diffusée via les tubes photomultiplicateurs (PMTs).

En amont :

L'enjeu est de focaliser au mieux la lumière au niveau de la lentille insérée dans la puce (figure 5.25). Pour cela, le laser est placé sur un support assurant sa perpendicularité avec la face avant de la puce et son positionnement en hauteur pour être au même niveau que la couche de SU-8. Il est extrêmement important que

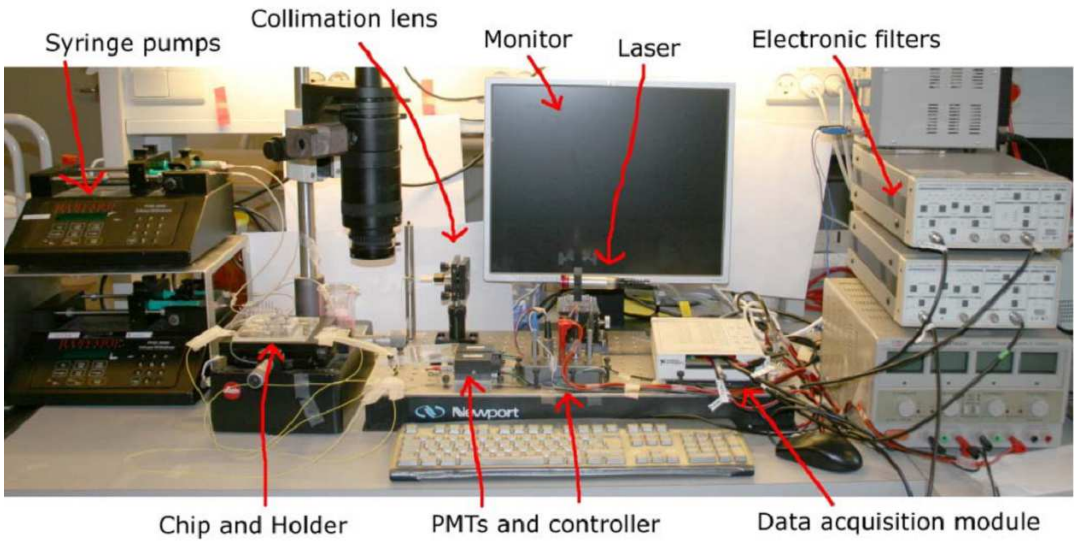


Figure 5.24 – Photo du montage du module de détection optique de DTU.

le support empêche toute rotation autour de la face avant de la puce, le mouvement translationnel est moins critique. Une lentille cylindrique à plan convexe a été choisie et placée entre le laser et la puce afin de focaliser le faisceau verticalement. Grâce à ce système, DTU augmente d'un facteur 10 l'intensité lumineuse arrivant sur la puce. Avec le démonstrateur final, ce gain est de 6 en raison de la plus grande distance focale de lentille utilisée - 140 mm au lieu de 40 mm - choisie pour des facilités d'intégration (problème d'encombrement à prendre en compte). Cette lentille permet également de réduire l'effet des translations verticales du laser. Une fois la position optimale de la lentille fixée, l'influence du mouvement du laser sur le point de focalisation est réduite ; l'angle incident au point focal peut changer sans altérer le positionnement du faisceau sur la puce. Cette liberté de translation/mouvement du laser permet de réduire le bruit vibrationnel.

En aval :

Le système comprend deux fibres optiques, une photodiode, un PMT, un connecteur fibre optique/PMT et un connecteur fibre optique/photodiode. Au début de l'intégration, la photodiode permettait de vérifier le bon alignement entre le laser, la lentille et la puce. Finalement cette vérification se fait à l'aide du PMT.

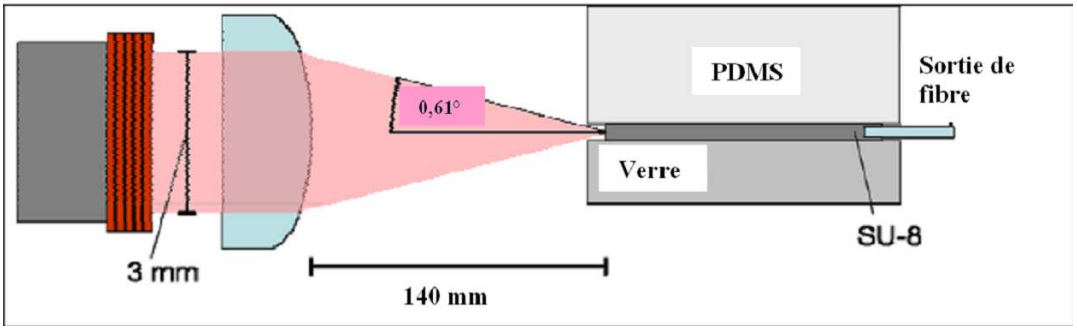


Figure 5.25 – Plan du montage en amont de la puce, vue de côté

Les données acquises par le PMT sont enregistrées via des cartes National Instruments avec une fréquence d'acquisition de 20 kHz pilotées par le logiciel Labview. Ces données sont ensuite traitées par un programme Matlab développé par Bertin. L'insertion de la fibre optique dans le connecteur du PMT est délicate et sensible. Nous avons noté un facteur 1000 sur l'intensité du signal pour différents positions de la fibre optique. Une habitude de manipulation rend cette connectique plus reproductible.

Résultats

Le premier test est la vérification du signal optique lorsque le système d'hydrofocalisation est activé. Ce signal, correspondant uniquement à la présence de liquide (ici de l'eau milli Q) dans le microcanal, renseigne sur le bruit de la mesure et donc de sa future sensibilité. D'après DTU, ce signal - ligne de base du signal - doit être proche de 1V avec un bruit moyen de 10 mV afin de détecter les billes lors des prochaines expériences. Cette valeur est atteinte pour un gain de PMT légèrement supérieur à celui conseillé (figure 5.26). Ce signal moyen ne doit pas être modifié en présence de billes. Les billes sont visualisées à travers l'apparition de pics de grande amplitude à partir du signal de base.

Expérimentalement, nous avons observé un léger décalage du signal de base (0,02 V) entre les signaux sans bille (tracé noir) et avec billes (tracé rouge, vert et bleu). Cet écart qui comparable au bruit moyen observé par DTU, est à mettre en relation avec le repositionnement de la puce entre ces deux types de signaux (figure 5.26). Le mouvement du tiroir (bas/haut) est donc assez reproductible.

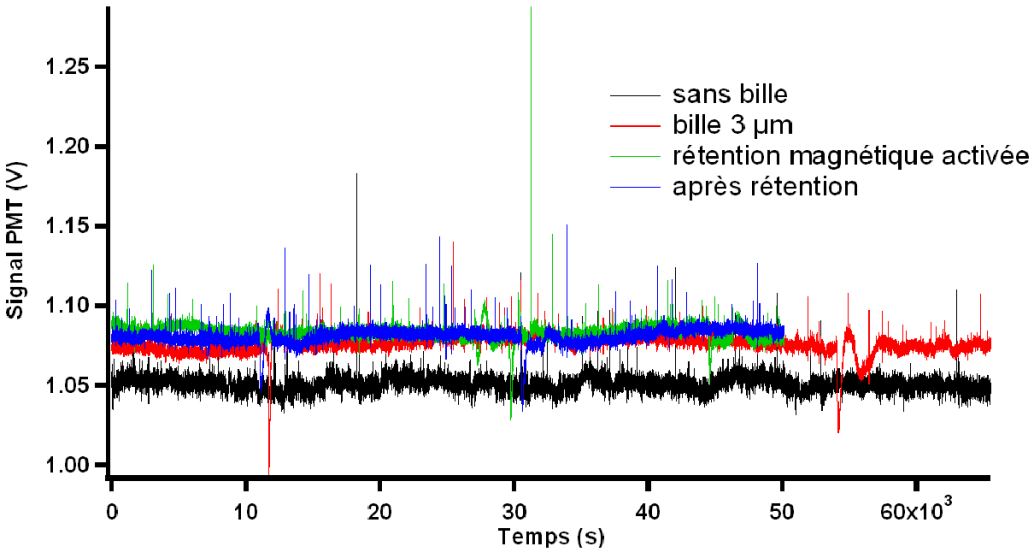


Figure 5.26 – Données brutes du PMT correspondant à l'intensité diffusée par la solution passant dans le canal microfluidique devant le détecteur ; en noir, sans bille - en rouge avec des billes magnétiques de 3 μm de diamètre - en vert, avec des billes magnétiques en activant la rétention magnétique - en bleu, après arrêt de la rétention.

Le signal sans bille comporte des pics d'assez grandes intensités - signal/bruit variant entre 1,04 et 1,13 - dus à la présence d'impuretés ou de billes restantes d'une précédente expérience. Un nouvel essai a été réalisé sur une autre puce avec un gain différent de PMT, le signal obtenu est plus homogène (figure 5.27).

Le signal correspondant aux billes de 3 μm possède des pics avec une fréquence élevée. D'après la concentration de l'échantillon injecté, la fréquence devrait être de 9 Hz pour une fréquence d'acquisition de 500 Hz. Le signal correspondant à l'activation de la partie rétention où les billes sont retenues entre les pointes magnétiques semble contenir moins de pic que le signal rouge. La présence de grands pics persiste dus à d'éventuelles impuretés.

En revanche, le signal obtenu juste après la désactivation de la rétention comporte de nombreux pics d'intensité élevée. Ceci pourrait correspondre à la présence d'agrégats formés par l'application du champ magnétique. Cette expérience laisse supposer le bon fonctionnement de la première phase de la partie rétention. Les expériences n'ont pas été poursuivies d'une part par manque de temps et d'autre

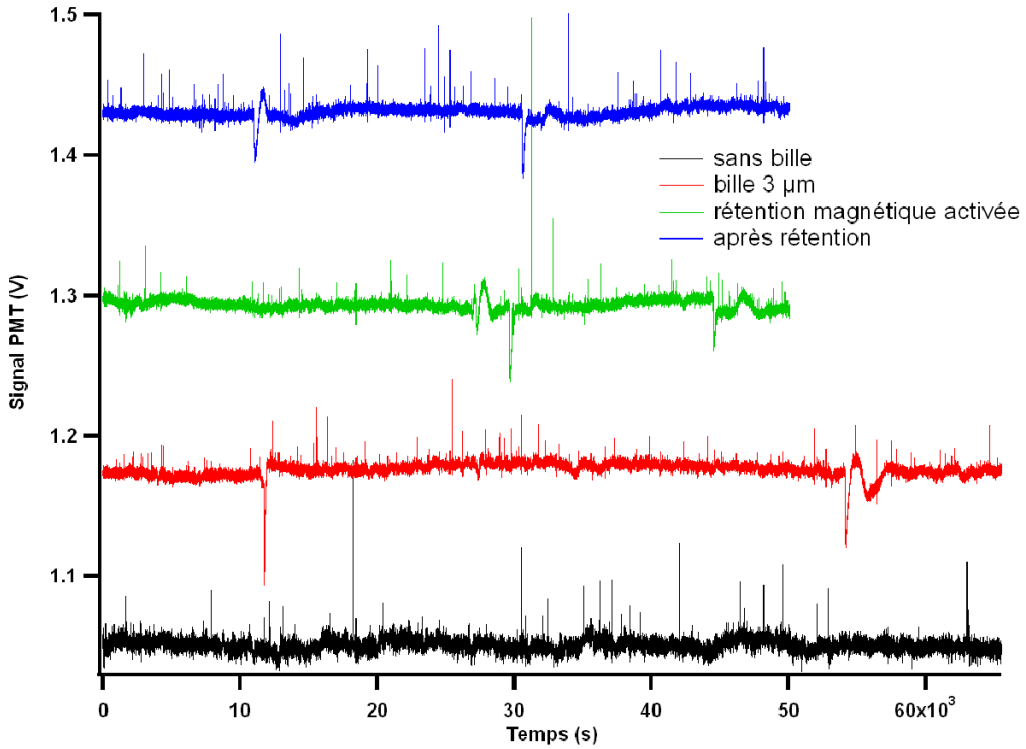


Figure 5.27 – Les signaux précédents sont décalés afin de mieux les comparer ; en noir, sans bille - en rouge avec des billes magnétiques de 3 μm de diamètre - en vert, avec des billes magnétiques en activant la rétention magnétique - en bleu, après arrêt de la rétention.

part en raison de la maturité du système optique intégré où la distinction entre un singulet et un doublet n'est pas systématique.

5.4 Conclusion

Grâce au dynamisme des partenaires du réseau européen, les deux puces microfluidiques initialement indépendantes sont rendues compatibles et ont pu être intégrées dans un démonstrateur. De nouvelles technologies ont été mises en place au niveau des puces microfluidiques - cytométrie sur puce, manipulation de billes magnétiques et capture d'analyte dans des microcanaux - et au niveau de l'intégration - développement de valve sur puce, validation du mode de pression et

d'aspiration séquentiel. L'objectif du projet européen à savoir la détection de la femtomole en un temps très court n'a pas été atteint. Ceci est dû à la maturité du système de détection optique qui ne permet pas de voir les billes de 1 μm et au dimensionnement du système de rétention qui ne permet pas de faire passer des débits rapides. Ces choix technologiques ont du être arrêtés assez tôt au cours du projet pour pouvoir commencer l'intégration. Ce travail mené en parallèle de la conception a freiné le dimensionnement et l'amélioration de ces systèmes microfluidiques.

Ce travail rend compte de l'écart existant entre une expérience réalisée au laboratoire où les questions de simplicité, d'encombrement, de rapidité ne se posent pas et son adaptation à un appareil industrialisé.

Chapitre 6

Conclusion

Les tests de diagnostic ont pour but de détecter et de quantifier un ou plusieurs analytes en milieu complexe. Depuis les années 80, leur évolution s'est concentrée sur la détection de très faibles quantités d'analytes. Actuellement, cette ligne directrice subsiste mais en parallèle les développements se portent sur de nouveaux objectifs comme la mise au point de tests simples, rapides, transportables et sensibles afin de répondre au mieux aux attentes des nouveaux marchés : le point of care et les pays émergents.

Au cours de ce travail, nous nous sommes confrontés à ces nouvelles problématiques. Nous avons choisi d'améliorer la sensibilité du test d'agglutination magnétique précédemment développé au laboratoire en raison de sa simplicité (test homogène) et de sa rapidité (manipulation de billes magnétiques). Nous avons montré que deux paramètres conditionnaient le seuil de détection de ce test à savoir le bruit (variabilité du signal sans antigène) et le signal émis par les billes. Le premier facteur dépend principalement du nombre de billes et le deuxième nous a amené à travailler avec de grandes billes nécessitant une nouvelle méthode de détection, la cytométrie en flux. Le gain en sensibilité n'a pas été clairement démontré en raison de la très faible réactivité des billes utilisées (500 fois moins réactives que les billes "habituelles").

Une chose est sûre, de grandes billes améliorent le signal, la cinétique et la thermodynamique au détriment d'une plus faible mobilité des objets sous champ.

Sous couvert d'une bonne réactivité, nous nous sommes aperçus que la première étape de notre test d'agglutination devenait thermodynamiquement et cinétiquement limitante aux faibles concentrations en analyte.

Dans le cadre du projet européen DetectHIV, nous avons essayé d'une part de franchir ces barrières à travers un système microfluidique et d'autre part de mettre au point un test complètement intégré. De nouvelles technologies ont vu le jour à l'EPFL (plug magnétique) et à DTU (cytométrie sur puce). Le système développé par l'EPFL est thermodynamiquement favorable, valide l'idée de préconcentration mais nécessiterait un nouveau dimensionnement fluidique pour réellement supplanter les tests en volume. L'intégration, quant à elle, a permis d'acquérir un certain savoir faire dans le domaine de la microfluidique, d'identifier les verrous technologiques et de développer un nouveau mode de circulation des fluides.

Pour conclure, ce travail a permis de cerner l'évolution possible des tests d'agglutination magnétique. La sensibilité du test originel c'est-à-dire en volume couplé à une détection turbidimétrique est fixée par le bruit de l'appareil de mesure. Ce paramètre étant peu optimisable, seule une augmentation de la taille des billes permettrait d'augmenter significativement la sensibilité du test (un facteur 10 en théorie). Au delà, une détection individuelle des objets via la cytométrie est nécessaire. D'une part, elle permet de travailler avec de gros objets afin d'amplifier grandement le signal et d'autre part, elle permet de s'affranchir du bruit de l'appareil de mesure. Le bruit mesuré est uniquement dû à la comptabilisation des populations, bruit inhérent au test de diagnostic. Avec cette configuration, un gain de sensibilité passe par une diminution du non-spécifique (relatif au comptage des populations) et par une augmentation de la réactivité des "grosses" billes. En dessous de la dizaine de femtomoles, la formation de complexe n'est plus assurée et devient longue, un changement de format fluidique est alors nécessaire. Le nouveau format fluidique testé, la microfluidique, s'avère très prometteur à condition d'intégrer une méthode de détection (cytométrique ou autre) et d'augmenter les débits.

Annexe 1 : Protocole du test d'agglutination avec les billes de 1 μm de diamètre

Produits :

- Tampon Phosphate 100 mM à pH6,7 ; filtré le jour de l'utilisation (filtre 13 mm PTFE 0,2 μm)
- Billes Magnétiques (appelées BM) Dynal 1 μm à 1 % lot n°H22030 diluées dans tampon phosphate à 0,01 %
- BSA-Biotine (à partir de poudre lot n°039K6009) à 10^{-7} M diluée dans le tampon phosphate

Appareils :

- Bobine + alimentation Sorensen DLM 150-20E
- Cytomètre Partec ML
- Etuve Memmert

Préparation échantillon :

- Mettre 13 μl de solution de billes magnétiques à 0,01 % dans tampon phosphate 100 mM à pH=6,7 dans un eppendorf 1 mL
- Ajouter 13 μl de tampon phosphate (échantillon témoin) ou solution de BSAb (échantillon)
- Incubation 10 min 37 °C - avec agitation soleil horizontal

Protocole agglutination :

- Positionner le tube eppendorf au centre de la bobine magnétique

– Appliquer pendant 30 s le champ fort à 50 mT
– Appliquer pendant 10 min le champ faible 1 mT

Protocole analyse :

– Agitation vortex puissance 5
– Prélever 20 μl et ajouter 980 μl d'eau ultra pure dans un tube Partec
– Agitation vortex puissance 5
– Lecture cytomètre

Bibliographie

[1] Revol A. http ://www.fda.gov/cdrh/oivd.

[2] www.ameli.fr.

[3] Curtis D. Chin, Vincent Linder, and Samuel K. Sia. Lab-on-a-chip devices for global health : Past studies and future opportunities. *Lab Chip*, 7(1) :41–57, 2007.

[4] C A Heid, J Stevens, K J Livak, and P M Williams. Real time quantitative pcr. *Genome Research*, 6(10) :986–994, October 1996.

[5] S. Siberil, C.-A. Dutertre, C. Boix, and J.-L. Teillaud. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie, et ... quelques succès cliniques. *Transfusion Clinique et Biologique*, 12(2) :114–122, June 2005.

[6] Coralie Alexandrenne, Anne Wijkhuisen, Fatima Dkhissi, Vincent Hanoux, Christophe Créminon, Didier Boquet, and Jean-Yves Couraud. Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hprp) in wild-type animals : A comparison between dna and protein immunizations. *Journal of Immunological Methods*, 341(1-2) :41–49, February 2009.

[7] *Principles and pratice of immunoassay (second edition).* Price C. P. et Newman D. J., 1991.

[8] J Freund. Agglutination of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 12 :124–141, 1925.

[9] Jacques M. Singer and Charles M. Plotz. The latex fixation test : I. application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*, 21(6) :888–892, December 1956.

[10] Yoichi Kumada, Kyoko Hamasaki, Yuki Shiritani, Takuhito Ohse, and Michimasa Kishimoto. Efficient immobilization of a ligand antibody with high antigen-binding activity by use of a polystyrene-binding peptide and an intelligent microtiter plate. *Journal of Biotechnology*, 142(2) :135–141, June 2009.

[11] Thorsten König and Arne Skerra. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on elisa plates. *Journal of Immunological Methods*, 218(1-2) :73–83, September 1998.

[12] E. Brynda, M. Houska, J. Skvor, and J. J. Ramsden. Immobilisation of multilayer bioreceptor assemblies on solid substrates. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(2) :165–172, February 1998.

[13] Nunc. http ://www.nuncbrand.com/en/default.aspx.

[14] *Immunoassay*. Diamandis E. P. and Christopoulos T. K., 1996.

[15] Howard C. Berg. *Random walks in biology, New expanded edition*. Princeton University Press, 1993.

[16] Julia Quinton, Lise Charruault, Marie-Claire Nevers, Hervé Volland, Jean-Pierre Dognon, Christophe Creminon, and Frederic Taran. Toward the limits of sandwich immunoassay of very low molecular weight molecules. *Analytical Chemistry*, 82(6) :2536–2540, 2010.

[17] Kenneth E. Rubenstein, Richard S. Schneider, and Edwin F. Ullman. Homogeneous enzyme immunoassay. a new immunochemical technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 47(4) :846 – 851, 1972.

[18] Nina-Beate Liabakk, Kjell Nustad, and Terje Espevik. A rapid and sensitive immunoassay for tumor necrosis factor using magnetic monodisperse polymer particles. *Journal of Immunological Methods*, 134(2) :253 – 259, 1990.

[19] Bruno Teste, Jérôme Vial, Stéphanie Descroix, Thomas Georgelin, Jean-Michel Siaugue, Jan Petr, Anne Varenne, and Marie-Claire Hennion. A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. *Talanta*, 81(4-5) :1703–1710, June 2010.

[20] ademtech. http ://www.ademtech.com/products.aspx.

[21] J. Baudry, C. Rouzeau, C. Goubault, C. Robic, L. Cohen-Tannoudji, A. Koenig, E. Bertrand, and J. Bibette. Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44) :16076–16078, October 2006.

[22] G. Schreiber, G. Haran, and H.-X. Zhou. Fundamental aspects of proteinâprotein association kinetics. *Chemical Reviews*, 109(3) :839–860, 2009. PMID : 19196002.

[23] *Practical immunoassay, (fourth edition).* Hay F. C. and Westwood O. M. R.

[24] L. Cohen-Tannoudji, E. Bertrand, J. Baudry, C. Robic, C. Goubault, M. Pellissier, A. Johner, F. Thalmann, N. K. Lee, C. M. Marques, and J. Bibette. Measuring the kinetics of biomolecular recognition with magnetic colloids. *Physical Review Letters*, 100(10), 2008.

[25] Xiliang Wang, Kui Li, Deshi Shi, Xiue Jin, Ning Xiong, Fuhu Peng, Dapeng Peng, and Dingren Bi. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of sulfadiazine in eggs and chickens. *Journal of Chromatography B*, 847(2) :289–295, March 2007.

[26] Paul Yager, Thayne Edwards, Elain Fu, Kristen Helton, Kjell Nelson, Milton R. Tam, and Bernhard H. Weigl. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442(7101) :412–418, July 2006.

[27] Anthony Moody. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(1) :66–78, 2002.

[28] David Bell, Chansuda Wongsrichanalai, and John W. Barnwell. Ensuring quality and access for malaria diagnosis : how can it be achieved ? *Nat Rev Micro.*

[29] A Jeandrot et Sotto A. Lavigne J-P. Les tests rapides de diagnostic des infections virales et parasitaires. *Spectra biologie*, 2006.

[30] Nathalie Khreich, Patricia Lamourette, Bernard Lagoutte, Cyril Ronco, Xavier Franck, Christophe Créminon, and Hervé Volland. A fluorescent immuno-

chromatographic test using immunoliposomes for detecting microcystins and nodularins, 2010-07-01.

[31] S. Eda, J. Kaufmann, W. Roos, and S. Pohl. Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for c-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic range. *J. Clin. Lab. Anal.*, 12(3) :137–144, 1998.

[32] Antti Valanne, Hanne Lindroos, Timo Lövgren, and Tero Soukka. A novel homogeneous assay format utilising proximity dependent fluorescence energy transfer between particulate labels. *Analytica Chimica Acta*, 539(1-2) :251 – 256, 2005.

[33] Warren C. ;W. Chan and Shuming Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281(5385) :2016–2018, September 1998.

[34] Chinmay Soman and Todd Giorgio. Sensitive and multiplexed detection of proteomic antigens via quantum dot aggregation. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4) :402–409, December 2009.

[35] Chinmay P. Soman and Todd D. Giorgio. Quantum dot self-assembly for protein detection with sub-picomolar sensitivity. *Langmuir*, 24(8) :4399–4404, April 2008.

[36] Guodong Liu, Ying-Ying Lin, Jun Wang, Hong Wu, Chien M. Wai, and Yuehe Lin. Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip. *Analytical Chemistry*, 79(20) :7644–7653, 2007.

[37] Peter Schuck. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules1. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1) :541–566, June 1997.

[38] Nico J. de Mol, Emke Plomp, Marcel J. E. Fischer, and Rob Ruijtenbeek. Kinetic analysis of the mass transport limited interaction between the tyrosine kinase lck sh2 domain and a phosphorylated peptide studied by a new

cuvette-based surface plasmon resonance instrument. *Analytical Biochemistry*, 279(1) :61–70, March 2000.

[39] ICx Technologies. http ://www.discoversensiq.com/products/sensiq/.

[40] R. Derda, A. Laromaine, A. Mammoto, S. K. Y. Tang, T. Mammoto, D. E. Ingber, and G. M. Whitesides. Paper-supported 3d cell culture for tissue-based bioassays. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 106(44) :18457–18462, 2009.

[41] Subbaraman. http ://www.technologyreview.com/biomedicine/25536/page1/.

[42] Savka I. Stoeva, Jae-Seung Lee, Jennifer E. Smith, Steven T. Rosen, and Chad A. Mirkin. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcoded nanoparticle probes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(26) :8378–8379, 2006.

[43] Dongwoo Kim, Weston L. Daniel, and Chad A. Mirkin. Microarray-based multiplexed scanometric immunoassay for protein cancer markers using gold nanoparticle probes. *Analytical Chemistry*, 81(21) :9183–9187, 2009. PMID : 19874062.

[44] Jwa-Min Nam, C. Shad Thaxton, and Chad A. Mirkin. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 301(5641) :1884–1886, September 2003.

[45] D. M. Bruls, T. H. Evers, J. A. H. Kahlman, P. J. W. van Lankvelt, M. Ovsyanko, E. G. M. Pelssers, J. J. H. B. Schleipen, F. K. de Theije, C. A. Verschuren, T. van der Wijk, J. B. A. van Zon, W. U. Dittmer, A. H. J. Immink, J. H. Nieuwenhuis, and M. W. J. Prins. Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles. *Lab Chip*, 9 :3504–3510, 2009.

[46] Mischa Megens and Menno Prins. Magnetic biochips : a new option for sensitive diagnostics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1) :702–708, May 2005.

[47] B.M. de Boer, J.A.H.M. Kahlman, T.P.G.H. Jansen, H. Duric, and J. Veen. An integrated and sensitive detection platform for magneto-resistive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10) :2366–2370, April 2007.

[48] Adarsh Sandhu. Biosensing : New probes offer much faster results. *Nat Nano*, 2(12) :746–748, December 2007.

[49] nature. http ://www.nature.com/nnano/journal/v2/n12/full/nnano.2007.398.html.

[50] Xiong Liu, Qiu Dai, Lauren Austin, Janelle Coutts, Genevieve Knowles, Jianhua Zou, Hui Chen, and Qun Huo. A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 130(9) :2780–2782, March 2008.

[51] Suhee Kim, Jaeyoung Lee, Seok Jae Lee, and Hye Jin Lee. Ultra-sensitive detection of ige using biofunctionalized nanoparticle-enhanced spr. *Talanta*, 81(4-5) :1755–1759, June 2010.

[52] A. J. Haes and R. P. Van Duyne. Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 4(4) :527–537, July 2004.

[53] Adam D. McFarland and Richard P. Van Duyne. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *Nano Letters*, 3(8) :1057–1062, August 2003.

[54] Richard S Gaster, Drew A Hall, Carsten H Nielsen, Sebastian J Osterfeld, Heng Yu, Kathleen E Mach, Robert J Wilson, Boris Murmann, Joseph C Liao, Sanjiv S Gambhir, and Shan X Wang. Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine. *Nat Med*, 15(11) :1327–1332, November 2009.

[55] Eric Stern, James F. Klemic, David A. Routenberg, Pauline N. Wyrembak, Daniel B. Turner-Evans, Andrew D. Hamilton, David A. LaVan, Tarek M. Fahmy, and Mark A. Reed. Label-free immunodetection with cmos-compatible semiconducting nanowires. *Nature*, 445(7127) :519–522, February 2007.

[56] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, and K. Takehiko. Integration of an immunosorbent assay system : Analysis of secretory human immunoglobulin a on polystyrene beads in a microchip. *Analytical Chemistry*, 72(6) :1144–1147, 2000. PMID : 10740851.

[57] Mark A. Hayes, Nolan A. Polson, Allison N. Phayre, and Antonio A. Garcia. Flow-based microimmunoassay. *Analytical Chemistry*, 73(24) :5896–5902, 2001.

[58] Sandrine Bronzeau and Nicole Pamme. Simultaneous bioassays in a microfluidic channel on plugs of different magnetic particles. *Analytica Chimica Acta*, 609(1) :105 – 112, 2008.

[59] Y. Moser, T. Lehnert, and M. A. M. Gijs. On-chip immuno-agglutination assay with analyte capture by dynamic manipulation of superparamagnetic beads. *Lab Chip*, 9(22) :3261–3267, 2009.

[60] Zhouping Wang, Jianqiang Hu, Yan Jin, Xin Yao, and Jinghong Li. In situ amplified chemiluminescent detection of dna and immunoassay of igg using special-shaped gold nanoparticles as label. *Clin Chem*, 52(10) :1958–1961, October 2006.

[61] Chang-Cheng You, Oscar R. Miranda, Basar Gider, Partha S. Ghosh, Ik-Bum Kim, Belma Erdogan, Sai Archana Krovi, Uwe H. F. Bunz, and Vincent M. Rotello. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer /'chemical nose/' sensors. *Nat Nano*, 2(5) :318–323, May 2007.

[62] J. H. E. Promislow, A. P. Gast, and M. Fermigier. Aggregation kinetics of paramagnetic colloidal particles. *Journal Of Chemical Physics*, 102(13) :5492–5498, 1995.

[63] R. Dreyfus. *Filaments magnétiques : application à la conception de capteurs de forces et de nageurs microscopiques artificiels.* 2005.

[64] *http ://www.giss.nasa.gov.*

[65] D. Zerrouki, B. Rotenberg, S. Abramson, J. Baudry, C. Goubault, F. Leal-Calderon, D. J. Pine, and M. Bibette. Preparation of doublet, triangular,

and tetrahedral colloidal clusters by controlled emulsification. *Langmuir*, 22(1) :57–62, January 2006.

[66] A. Moldavan. Isotopic co2 and o2 in plants ? *Science*, 2055 :455, 1934.

[67] Howard M. Shapiro. *Pratical Flow Cytometry, fourth edition*. John Wiley & Sons, 2003.

[68] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon. Alignment and sensitive detection of dna by a moving interface. *Science*, 265(5181) :2096–2098, September 1994.

[69] A. Rida and M. A. M. Gijs. Manipulation of self-assembled structures of magnetic beads for microfluidic mixing and assaying. *Analytical Chemistry*, 76(21) :6239–6246, 2004.

[70] A. Rida and M. A. M. Gijs. Dynamics of magnetically retained supraparticle structures in a liquid flow. *Applied Physics Letters*, 85(21) :4986–4988, 2004.