



Colloïdes magnétiques: auto-organisation et applications biologiques

Cécile Goubault

► To cite this version:

Cécile Goubault. Colloïdes magnétiques: auto-organisation et applications biologiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2004. Français. NNT: . tel-00008382

HAL Id: tel-00008382

<https://pastel.hal.science/tel-00008382>

Submitted on 7 Feb 2005

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.

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

Spécialité :

Matière Condensée : Chimie et Organisation

présentée par

Cécile GOUBAULT

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

**Colloïdes magnétiques :
auto-organisation et applications biologiques**

soutenue publiquement le 23 Mars 2004

devant le jury composé de :

Mme.	Françoise BROCHARD-WYART,	Présidente
M.	Fernando LEAL-CALDERON,	Rapporteur
M.	Jean-Marc DI MEGLIO,	Rapporteur
M.	Jérôme BIBETTE,	co-Directeur
M.	Jean-Louis VIOVY,	Directeur
M.	Bernard MANDRAND,	

Les remerciements ayant la faveur des lecteurs les plus pressés, qui sont aussi les plus nombreux, j'espère que les lignes qui suivent n'en décevront aucun.

Ma thèse a débuté dans le Laboratoire Physico-Chimie Curie dirigé alors par Jacques Prost. Je le remercie de m'y avoir accueillie de manière chaleureuse. J'adresse également mes remerciements à Pierre Turq, Directeur du Laboratoire Liquides Ioniques et Interfaces Chargées, pour m'avoir permis de terminer ma thèse au sein de son laboratoire.

Françoise Brochart-Wyart a accepté de présider mon jury. J'aimerais qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude, tant pour le modèle féminin scientifique qu'elle incarne, que pour l'enthousiasme qu'elle suscite autour d'elle.

Je veux également témoigner de ma sincère reconnaissance à Fernando Leal-Calderon et à Jean-Marc Di-Melgio qui ont assumé la tâche de rapporteurs de mon manuscrit.

Enfin, que soient remerciés les "membres invités" de mon jury, Christian Parry (de la Société Serbio) et Marc Fermigier pour leur présence.

Ce travail a été effectué dans deux laboratoires distincts et donc sous l'autorité de deux directeurs. Ceci a indéniablement contribué à la richesse de ces trois années aussi bien au plan scientifique qu'au plan humain. Les compétences des chefs et la qualité de leur équipe se sont additionnées et ont rendu mes recherches plus fructueuses. Cette direction bicéphale n'a pas moins requis de ma part un peu de diplomatie pour jongler avec deux approches, deux visions des choses, deux ambitions, deux personnalités...

Jean-Louis Viovy m'a laissé une grande liberté face à mon sujet. Il m'a apporté les moyens financiers nécessaires pour mener à bien mes travaux et les présenter lors de congrès. De part sa culture scientifique et les rencontres qu'il m'a permis de faire, il m'a beaucoup appris dans divers domaines (microfluidique, électrophorèse...).

Jérôme Bibette m'a guidée dans mes choix depuis notre première rencontre au CRPP à Bordeaux en 1997. Je le remercie pour ce bout de chemin parcouru sous sa houlette. Toute cette aventure n'aurait pas eu lieu sans cette rencontre due à M. Pacault à qui j'adresse ici toute ma reconnaissance.

Deux directeurs mais également deux équipes...dont l'organisation "sur la paillasse" m'a donné du fil à retordre –*QUI a piqué mon scalpel bleu et ma petite spatule ? !*–. Or, deux équipes c'est également deux fois plus de bavardages, de fous-rires, de fêtes et d'amis. Un grand merci, donc, aux "Viov's" : Valessa, Renaud, Jérémie, Aurélien, Charlie, Zuzanna, Gaudeline, Christelle, Lysiane, Dominique, Nicolas, Aurélie, Giovanni, Marcela, Kevin, Emmanuel, Stéphanie, Anna, Erdem, Amit, Claus et à l'équipe de "PC" : Florence, Isabelle, Ema-

nuel, Jacques, Rémi, Catherine, Laetitia, Nicolas, Caroline, Lydie, Anne, Jean, Sébastien, Jérôme, Julie, Lise, Julien, Guy, Manon, Aurélie, Benjamin, Erwan, Alexandre, Swapan, Geneviève, Gilles et Martine.

Cette thèse est en quelque sorte l'aboutissement d'un parcours scolaire. Aussi, j'aimerais signifier aux professeurs qui ont jalonné ma scolarité toute ma gratitude pour m'avoir appris la persévérance, transmis le goût du savoir et contribué à la formation de mon esprit scientifique : M. Herbelot, M^{me} Legrand dont le cours sur les angles donné lors d'une classe de voile à Lathus restera gravé dans ma mémoire, M^{me} Depond, M^{me} Vogel, M^{me} Pihouée, M^{me} Arnoux, M. Petitjean et M. Gasparoux.

J'ai découvert la recherche au CRPP de Bordeaux. Pour avoir guidé mes premiers pas dans cet univers alors inconnu, merci à Philippe Gorria, Valérie Ravaine, Véronique Schmitt, Karl Pays, Florence Guimberteau, Tatiana Dimitrova, Joanna Kahn et Bernard Pouliny. Mais surtout, comment ne pas remercier Fernando Leal-Calderon ? Je voudrais lui dire qu'au-delà de son talent inégalé pour la pêche à la morue, il constitue pour moi un véritable modèle de chercheur, à la fois créatif, rigoureux et si humain. Les interminables discussions scientifiques avec lui et son thésard Karl, le soir, devant le microscope, resteront dans ma mémoire.

A mon arrivée à Paris, mes connaissances en biologie étaient quasi-inexistantes. Je veux féliciter pour leurs conseils et leur patience les biologistes auprès desquels j'ai appris la culture cellulaire et la capture de cellules, ainsi que le greffage des protéines. Merci donc à Zuzana Bilkova, Nathalie Blin, Nelly Henry, Claire Hivroz et son équipe (Céline, Nicolas, Francesc), Dominique Godfrin ainsi que le 3^{ème} étage de Curie (Anne-Christine Brunet, Eric Brouzes, Emmanuel Farge et François Amblard).

Rendons à César ce qui est à César. Ce travail n'aurait pu se faire sans les astuces, protocoles, et autres montages réalisés par une longue liste de personnes. J'espère n'oublier personne :

merci à Marc Fermigier, Pierre Jop et Caroline Derec pour leur contribution au travail sur les filaments magnétiques flexibles. Marc, merci pour cette collaboration, pour ta patience et ta gentillesse. Je n'oublierai pas la tentative d'ascension du Half-Dome ;

merci à Pierre Nassoy et Axel Buguin pour m'avoir appris à manipuler et biotinyler des globules rouges ;

merci à Pierre-Henri Puech pour ses dons de vésicules géantes ;

merci à Valessa Barbier et Jérémie Weber pour la synthèse de polymères ;

merci à Charlie Gosse pour son magnétisme. Bien que mauvais porteur, tu as été un excellent guide au Japon, merci ;

merci à Renaud Fulconis et Aurélien Bancaud pour leurs conseils afin d'éviter *la* bulle dans les micro-canaux ;

merci à Catherine Rouzeau pour avoir partagé les galères du greffage, toujours avec sourire et enthousiasme ;

merci à Rémi Dreyfus pour son aide sur les premières manips de chaînes magnétiques permanentes avec la MCT, pour les photos de lettres magnétiques et pour les petits calculs... ;

merci à Jacques Fattaccioli pour son enthousiasme débordant et les discussions sur la formulation des émulsions ;

merci à Philippe Girard pour son soutien logistique L^AT_EXet pour avoir répondu présent à chaque fois qu'un coup de main a été nécessaire ;

merci à Michel Petit, Gilles Rousseau et Patrice Jenffer pour la réalisation des bobines magnétiques : sans eux, une grande partie de ce travail n'aurait pu se faire ;

merci à Jean-Hugues Codarbox pour m'avoir évité de "prendre le jus" ;

merci à Axel Buguin, Pascal Silberzan ainsi qu'à l'équipe de Patrick Tabeling pour m'avoir permis d'utiliser les salles blanches ;

merci à David Weitz pour son éclairage sur les manips de flexibilité ;

merci à M. Abdelhamid Elaïssari, M. Jean-Claude Daniel, M. Richard Vidal pour leur aide bibliographique.

Je tiens à adresser un mot spécial à Isabelle Génois et à Florence Thivilliers. Isabelle a réalisé la plupart des expériences permettant de mettre au point les protocoles de quantification des protéines greffées sur les particules magnétique : merci d'avoir effectué cette masse de tests malgré ta répugnance au greffage. Ton aide m'a été extrêmement précieuse. Florence me succède sur ce travail. Son dynamisme a éclairé la fin de ma thèse. Je lui souhaite un brillant parcours.

Je remercie la société ADEMTECH qui m'a fourni les particules magnétiques. Merci plus particulièrement à Manuel Gaboyard pour les clichés et les réponses à mes nombreuses questions pénibles (!), Benoît Grillet, Philippe Gorria ainsi que M. Bernard Plichon pour nos discussions et ses conseils sur mon orientation professionnelle.

Parce qu'ils nous simplifient la vie au quotidien, merci à Lysiane Charlaigre, Christelle Godfroid, Lise Michelot, Francine Vérin, Françoise Annotiau, Nicole Blandeau, Patrick Suchet – merci pour les brioches, oeufs de Pâques et

surtout un grand merci pour l'organisation du pot –, et Brigitte Da Silva qui chaque matin illumine notre journée d'un sourire et d'une parole douce.

Parce qu'ils ont lu, lu et relu (et corrigé!) mon manuscrit, parce qu'ils m'ont fait répéter et permis de passer ainsi une barrière d'activation élevée – ce dont mes futurs collaborateurs me seront éternellement reconnaissants (Lydie, ça ne te rappelle rien?...), merci à Emanuel Bertrand –sans toi, l'ambiance dans l'équipe ne serait pas la même. Merci pour tes paroles rassurantes et ton amitié–, Jean Baudry –partager le bureau avec toi fut un plaisir. Merci pour tes suggestions pertinentes.–, Marc Fermigier, Julien Legrand, Laetitia Cohen-Tannoudji, Rémi Dreyfus, Jacques Fattaccioli –“Monsieur Typographie”–, Renaud Fulconis –mon metteur en scène–, Anne Koenig, Caroline Robic, Giovanni Capello. Merci à mon frère Julien qui, malgré un emploi du temps de ministre, a su trouver le temps de relire tout le manuscrit sans forcément le comprendre.

Les cours de yoga n'ayant pas suffi à canaliser mon stress, j'ai pu arriver au bout de ces trois années sans Lexomil grâce aux matchs de badminton et aux discussions poétiques dans les vestiaires –*Si tu te retrouves seul sur une île déserte tu choisis qui ?*–. Un très très grand merci à mes co-équipiers : Bruno (le smasher fou), le piétineur de volants Nico (le seul à réussir “La Lequeux”) et Manu (le charmeur des hydres-gardiennes).

Merci aux familles (Goubault USA, Cartron, Dumontet, Puech) et aux amis Fix, Véro –qui s'est occupée des sorties culturelles (expos, théâtre, ciné) craignant de me voir transformée en un rat de labo–, Renan, Karine et Vincent, Dolo, Sandra, Marie, Valessa, Renaud, Charlie bibi et Emanuel pour leur écoute et les moments de distraction.

Pierre-Henri a activement participé à ce travail dont il connaît chaque manip, chaque phrase (du mansucrit), chaque mot (de la soutenance). Merci pour m'avoir accompagnée au quotidien. Merci pour tout.

Je dédie ce travail à mes parents et mes frères qui m'ont toujours soutenue.

Table des matières

Introduction	13
1 Colloïdes magnétiques	17
1.1 Applications	17
1.1.1 Utilisations biomédicales	18
1.1.2 Utilisation dans les biotechnologies	23
1.1.3 Utilisation en biophysique	25
1.1.4 La microfluidique : un nouveau champ d'application	29
1.2 Caractéristiques requises	32
1.2.1 Propriétés magnétiques	32
1.2.2 Taille et distribution	36
1.2.3 Surface	36
1.3 Préparation	42
1.3.1 Ferrofluides	43
1.3.2 Grains d'oxydes et matrice synthétisés séparément	44
1.3.3 Grains synthétisés au contact de la matrice	46
1.3.4 Matrice synthétisée en présence des grains magnétiques	48
1.3.5 Vers de nouveaux matériaux	50
Bibliographie	52
2 Auto-assemblages irréversibles linéaires	65
2.1 Assemblages colloïdaux – Etat de l'art	66
2.1.1 Assemblages colloïdaux $k_B T$ -induits	66
2.1.2 Chaînes magnétiques	67
2.1.3 Chaînes magnétiques irréversibles	71
2.2 Collage magnéto-stimulé : adsorption	73
2.2.1 Principe	74
2.2.2 Particules magnétiques stables	75
2.2.3 Obtention de chaînes irréversibles	79
2.2.4 Cinétique d'adhésion par le PAA	82
2.2.5 Le caséinate de sodium	84
2.3 Collage magnéto-stimulé : spécifique	86
2.4 Décoration des chaînes	89

2.4.1	Couches de polyelectrolytes	89
2.4.2	Décoration par couplage covalent	91
2.5	Collage “post-organisation”	93
2.5.1	Le PDMA	94
2.5.2	La poly-L-lysine	94
2.6	Conclusions et perspectives	94
	Bibliographie	96
3	Filaments magnétiques flexibles	103
3.1	Flexibilité des filaments magnétiques	104
3.2	Filaments flexibles	105
3.3	Métastabilité sous champ magnétique	105
3.4	Méthodes expérimentales	107
3.4.1	Description théorique	109
3.4.2	Résultats et discussion	115
3.4.3	Conclusion	122
3.5	...comme capteurs micromécaniques	123
	Bibliographie	130
4	Auto-assemblages 3D — tri cellulaire	137
4.1	Tri cellulaire	139
4.1.1	Techniques conventionnelles	141
4.1.2	En microfluidique	145
4.1.3	Séparation immunomagnétique	148
4.2	Auto-assemblages : principes	151
4.3	Caractéristiques du réseau	153
4.4	Montage expérimental	156
4.4.1	Montage	156
4.4.2	Produits	156
4.5	Réseau irréversible	157
4.5.1	Pas du réseau	159
4.5.2	Épaisseur des colonnes – Solidité	160
4.5.3	Fonctionnalisation	162
4.6	Premières migrations	164
4.7	Conclusions et perspectives	165
	Bibliographie	167
	Conclusions et perspectives	173
	Annexe 1 : Fabrication de chaînes permanentes	179
	Annexe 2 : Décoration de chaînes permanentes	185
	Annexe 3 : Filaments formés de liens spécifiques biologiques	209

Annexe 4 : Dosage des protéines	213
Annexe 5 : Détermination de la longueur du lien	233
Annexe 6 : Fabrication de canaux en PDMS	241
Annexe 7 : Les bobines magnétiques	243

Introduction

Les latex magnétiques ont vu le jour il y a une vingtaine d'années. Ces particules connaissent toujours un essor important dans le domaine biomédical afin de concentrer, purifier, transporter, séparer des espèces – molécules, cellules, bactéries,...

Ces objets, utilisés par beaucoup, ne sont pas de simples petites “billes” magnétiques. Ce sont des *objets de haute technologie*, à la croisée des chemins de la physique, de la chimie et de la biologie. Leur potentiel considérable vient de leur manipulation aisée, à distance, via un champ magnétique. Leur petite taille leur permet d'être à l'échelle des objets d'intérêt, de présenter une grande surface spécifique et d'être insérables dans des microsystèmes comme les laboratoires sur puce, très en vogue à l'heure actuelle.

Leur aspect moins connu des utilisateurs courants est leur capacité à *s'auto-organiser* sous champ. Ces particules magnétiques peuvent ainsi former des structures allant de la simple ligne à un réseau tridimensionnel.

Le travail, présenté ici, a été consacré à l'étude de certains de ces assemblages et au développement d'applications à visée biologique.

Ce manuscrit se découpe comme suit. Le Chapitre 1 présente les *concepts* nécessaires ainsi qu'une *revue bibliographique* de l'utilisation de ces objets. Le Chapitre 2 introduit l'obtention de *filaments*, véritables “colliers de perles”, où les particules magnétiques sont reliées par des molécules ou des complexes qui font office de liens. De là, une *méthode nouvelle* basée sur la courbure de ces chaînes et permettant de mesurer la flexion d'un lien est exposée au Chapitre 3. L'originalité de cette technique repose sur le fait d'observer *macroscopiquement* des chaînes et d'en tirer une information *microscopique* sur le lien. Enfin, le Chapitre 4 détaille l'utilisation de ces objets comme *matrice de séparation cellulaire* intégrée dans un dispositif microfluidique.

En guise de préambule...

... au Chapitre 1

Les particules magnétiques sont vendues depuis une vingtaine d'années et l'on pourrait penser que ce sont des objets universels – “utilisables les yeux fermés”.

En fait, il n'en est rien car cet objet, a priori simple, est le fruit de différents savoir-faire qu'il faut acquérir et coordonner tant pour les fabriquer que pour les utiliser : synthèses inorganique et organique, physico-chimie (stabilité colloïdale) et biochimie (fonctionnalisation des particules).

Obtenir des particules sphériques, de taille souhaitée, calibrées, fortement magnétiques, stables et fonctionnalisées reste un point délicat et crucial, comme nous le montrerons ici.

Cette partie permet également d'introduire des notions clés qui nous seront utiles par la suite, comme la fonctionnalisation, la capture cellulaire et la manipulation de molécules.

Chapitre 1

Colloïdes magnétiques – Etat de l’art

Les particules magnétiques sont des matériaux composites constitués d’une matrice organique¹⁾ et de grains magnétiques. (Fig.1.1). Les particules sont dites colloïdales lorsque leur taille est comprise entre 10 nm et 10 μm . La présence des grains magnétiques permet leur manipulation facile grâce à un champ magnétique.

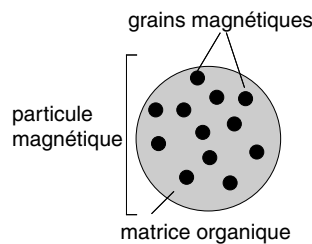


FIG. 1.1 – Particule magnétique constituée d’une matrice organique et de grains magnétiques. La nature et la structure de la matrice organique et des grains magnétiques varient selon les procédés de fabrication.

On trouve sur le marché une grande diversité de particules magnétiques répondant à de nombreuses applications. Leurs caractéristiques et leurs voies d’obtention sont tout aussi diverses et seront détaillées par la suite.

1.1 Applications

Elles sont largement utilisées en biologie et en médecine, aussi bien dans des laboratoires académiques qu’en recherche clinique, afin de transporter des objets biologiques (acides nucléiques, bactéries, virus, protéines, cellules). Fixés sur les particules magnétiques, ces objets peuvent ainsi être purifiés, concentrés, détectés ou tout simplement déplacés.

¹La matrice peut parfois être minérale : pour des exemples de particules magnétiques en silice se reporter à www.kisker-biotech.com. Dans la suite nous ne nous intéressons qu’au cas des particules constituées d’une matrice organique.

Nous allons passer en revue les applications biomédicales les plus courantes pour ensuite évoquer des utilisations plus ponctuelles mais tout aussi prometteuses (en biophysique et en microfluidique).

1.1.1 Utilisations biomédicales

Capture d'objets biologiques – Diagnostic

Quelle que soit l'utilisation des particules *i.e.* simple transport, purification, concentration, la première étape passe par la *capture* de l'objet biologique en question. Celle-ci peut être *directe* ou *indirecte* (Fig.1.2).

Dans le cas de la *capture directe*, les particules magnétiques sont ajoutées à l'échantillon contenant les objets à capturer. Après incubation dans des conditions permettant la fixation des objets sur les particules, celles-ci sont séparées du milieu par application d'un champ magnétique. En pratique, un aimant est placé sur la paroi du tube contenant l'échantillon. Les particules migrent vers l'aimant et se concentrent au niveau de la paroi. Il suffit ensuite de prélever la phase continue qui ne contient alors plus de particules magnétiques.

La *capture indirecte* consiste à faire réagir l'objet cible avec une molécule pour laquelle il a une forte affinité. Les particules magnétiques sont ensuite ajoutées pour capturer ce complexe. Cette méthode est souvent plus spécifique que la capture directe [Hancock and Kemshead, 1993] *i.e.* on choisit un couple ayant une forte affinité, souvent un ligand biotinylé et des particules fonctionnalisées avec de la streptavidine ($K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$, K_a , constante d'affinité).

Notons que l'on peut aussi séparer des espèces en ne capturant pas l'objet qui nous intéresse mais en extrayant les autres de l'échantillon, c'est ce que l'on appelle le *tri négatif* ou *déplétion*.

Qu'elle soit directe, indirecte, positive ou négative, la capture d'objets peut se faire par immuno-affinité ou par simple adsorption.

Capture par immuno-affinité

La capture immunologique consiste à utiliser des anticorps² spécifiques de l'objet à séparer.

On peut ainsi extraire des antigènes³, des cellules, des parasites [Lejon and Büscher, 2003] ou des bactéries selon leurs marqueurs de surface. Cela suppose une bonne connaissance des caractéristiques des substances en présence

²Encore appelé immunoglobuline, un anticorps est une protéine fabriquée par des cellules chargées des réactions immunitaires et dirigée de façon spécifique contre un antigène. Se reporter à l'Annexe 5 pour plus de précisions.

³Un antigène est une substance ou une structure cellulaire définie par sa capacité à provoquer une réaction immunitaire : production d'anticorps ou réaction cellulaire.

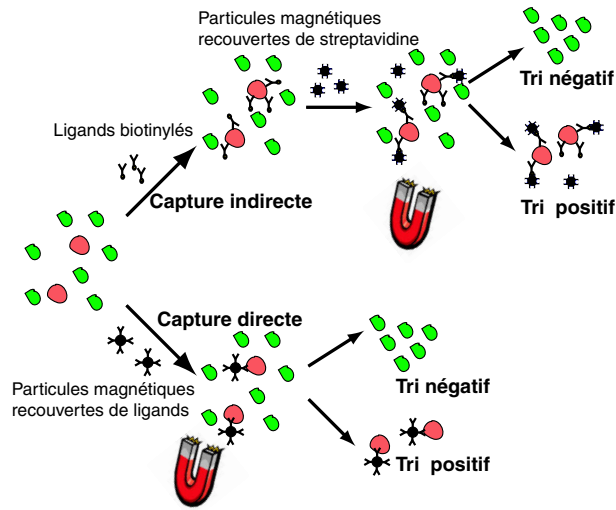


FIG. 1.2 – Différents modes possibles de capture d'objets par des particules magnétiques : direct, indirect, positif, négatif.

afin de choisir les critères qui discriminent le mieux l'objet-cible.

Remarque sur le détachement des particules. Pour enlever les particules fixées sur l'objet capturé, deux stratégies ont été développées (Fig.1.3) :

- fixer l'anticorps sur la particule via une molécule d'ADN. Ce lien peut ensuite être coupé par une enzyme (DNAase). Cette solution est simple et surtout universelle. Néanmoins, dans le cas des cellules, l'utilisation de cette enzyme endommage le cytoplasme [Blin, 2003] ;
- ajouter un anticorps (II)⁴ qui reconnaît l'anticorps fixé sur les particules et qui va entrer en compétition avec le marqueur de surface. En venant se fixer sur l'anticorps greffé, (II) permet le détachement de la particule, sans endommager l'objet (Stratégie DETACHaBEAD® de DYNAL).

La méthode la moins invasive reste toutefois le tri négatif.

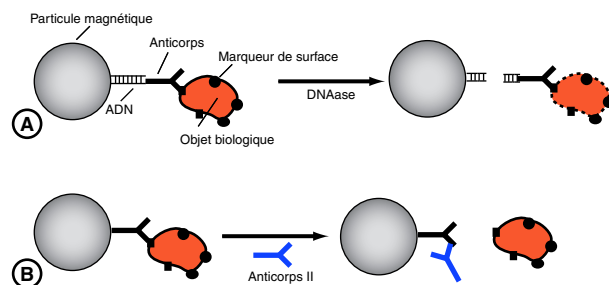


FIG. 1.3 – Différentes stratégies pour détacher la particule biologique. A : utilisation d'une enzyme qui coupe l'ADN reliant l'anticorps à la particule. Cette voie peut endommager l'objet biologique. B : utilisation d'un anticorps II qui entre en compétition avec le marqueur cellulaire.

⁴On utilise généralement un anticorps polyclonal anti-Fab.

Capture par adsorption

On peut également capturer des substances par adsorption. Celle-ci est le plus souvent régie par des interactions électrostatiques et hydrophobes (voir paragraphe 1.2). Ont ainsi été capturés des acides nucléiques [Holschuh, 2003], mais également des virus tels que celui de la fièvre jaune (type 3), de la fièvre de Lassa (type 4) et le virus Ebola [Veyret, 2003]. Pour détacher les particules, il suffit de jouer sur le pH et la salinité du milieu.

Si la communauté scientifique connaît l'utilisation des particules magnétiques à des fins de capture de protéines et de cellules, la capture de bactéries est restée, elle, plus en retrait (Fig.1.4). La plupart des bactéries porte une flagelle constituée d'une protéine, la fimbria. On peut donc les capturer à l'aide de particules magnétiques fonctionnalisées avec de l'anti-fimbria [Safarik et al., 1995]. La détection de bactéries est primordiale dans l'industrie alimentaire. Les particules magnétiques permettent la détection de Salmonelle ou de Listeria en 10 min contre 24 h avec les techniques traditionnelles (filtration, chromatographie, culture ...).



FIG. 1.4 – Bactéries E. Coli attachées aux Dynabeads (cliché de microscopie électronique 12500X. www.dynalbiotech.com).

Séparation magnétique

Dans ce qui va suivre, nous noterons $\vec{M} = \chi \vec{H}$ l'aimantation du matériau, avec χ la susceptibilité magnétique de la particule et $\vec{H}$ l'excitation magnétique. On introduit aussi $\vec{m} = V\vec{M}$, le moment magnétique d'une particule de volume V . $\vec{H}$ et $\vec{B}$ sont reliés par $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$ où μ_0 est la perméabilité du vide.

Lorsque l'on place un aimant contre un tube contenant des particules magnétiques, on constate que celles-ci migrent vers l'aimant (Fig.1.5). On peut modéliser ceci de manière simple en considérant une particule de rayon r dans un milieu de viscosité η placée dans un champ magnétique $\vec{B}$. Elle est soumise à

- une force magnétique : $\vec{F}_m = (\vec{m} \cdot \vec{g} \vec{rad}) \vec{B} = \frac{V\chi}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \vec{g} \vec{rad}) \vec{B}$,
- une force de friction visqueuse : $\vec{F}_v = -\zeta \vec{v}$ avec v la vitesse de la bille et ζ le coefficient de friction égal à $6\pi\eta r$

En régime stationnaire, les forces se compensent : $\vec{F}_m + \vec{F}_v = \vec{0}$.

Si on note x la direction du gradient de champ magnétique, on en déduit que

$$v_x = \frac{V\chi}{\mu_0} \times \frac{1}{6\pi\eta r} \times B \frac{\partial B}{\partial x}.$$

La vitesse de séparation est influencée par le rayon (hydrodynamique) des particules et le taux d'oxyde.

Pour donner un ordre de grandeur : prenons un tube Eppendorf de 1 cm de diamètre. Pour un aimant classique, $B \frac{\partial B}{\partial x}$ est de l'ordre d'une dizaine de $T^2.m^{-1}$. Pour des particules de $0.5 \mu m$ de rayon ayant une susceptibilité de 1 dans un fluide de viscosité $\eta=10^{-3} Pa.s$, la vitesse de migration est $\sim 450 \mu.s^{-1}$. Il faut donc une trentaine de secondes pour attirer toutes les particules vers l'aimant⁵. La séparation est donc plus rapide et plus simple que n'importe quelle méthode de séparation (centrifugation ...).

Les particules magnétiques sont donc *simples d'utilisation, permettent une manipulation rapide d'objets biologiques (ADN, protéines, cellules, virus, bactéries,...) et sont compatibles avec une automatisation des procédés* (Biomek® 2000 de BECKMAN COULTER pour la capture d'ADN, PHenoSense™ de VIROLOGIC INC. pour du phénotypage). Elles ont ainsi *remplacé* dans bien des cas *la centrifugation et la filtration*.

Support solide

Les particules magnétiques peuvent également constituer des supports idéaux car (i) elles offrent une grande surface spécifique; (ii) elles sont mobiles et permettent ainsi un gain de temps quand les phénomènes de diffusion entrent en compte comme c'est le cas pour le test ELISA⁶; (iii) différentes particules

⁵Note : en fait, la séparation est plus rapide. En effet, comme nous le verrons dans le Chapitre 2, les particules s'organisent en chaînes de N particules, de longueur L et de largeur d . Dans ce cas,

$$\begin{aligned} - \text{ la force magnétique est : } \vec{F}_m &= (\vec{m}.grad)\vec{B} = (Nm_N.grad)\vec{B} = N \frac{V\chi}{\mu_0} \vec{B} grad \vec{B}, \\ - \text{ la force de friction est : } \vec{F}_v &= -\zeta \vec{v} \text{ avec } \zeta \text{ le coefficient de friction égal à } \frac{4\pi\eta L}{\ln(\frac{L}{d}) + 1} \end{aligned}$$

[Fermigier, 1999]

Si $d = 2r$ alors $L = N2r$ d'où $v_{sphère} \simeq v_{chaîne}$

$$\text{Si } d > 2r \text{ alors } v_{chaîne} = \frac{NV\chi}{\mu_0} \times \frac{\ln(\frac{L}{d}) + 1}{4\pi\eta L} \times B \frac{\partial B}{\partial x} = \frac{N_d V\chi}{\mu_0} \times \frac{\ln(\frac{L}{d}) + 1}{4\pi\eta} \times B \frac{\partial B}{\partial x} \simeq N v_{sphère}$$

Une chaîne épaisse migre donc plus vite qu'une particule.

⁶Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays



FIG. 1.5 – Principe de la séparation magnétique : la particule est soumise à une force magnétique qui attire la particule vers l'aimant et une force de friction qui s'y oppose. Sur le cliché, le surnageant est devenu limpide signe que toutes les particules sont regroupées sur la paroi de l'éppendorf en contact avec l'aimant (Cliché extrait de www.qiagen.com)

mélangées permettent une analyse multi-critères ; (iv) elles peuvent être intégrées dans un procédé automatisé (Access[®] Immunossay System de BECKMAN COULTER).

Le fait qu'elles soient magnétiques facilite les étapes de rinçage. Un exemple d'utilisation est la digestion enzymatique par de la trypsine⁷. La fixation des enzymes sur des particules permet (i) de les retirer du mélange réactionnel, (ii) de les réutiliser (iii) d'améliorer leur stabilité au stockage (fixées, elles ne peuvent plus se digérer entre elles) [Bílková et al., 2002].

Thérapie

Des drogues fixées sur les particules magnétiques peuvent être amenées à leur cible par un champ magnétique [Kim et al., 2002].

[Alexiou et al., 2001] ont injecté, via l'artère femorale, des particules recouvertes d'un anticancéreux à des lapins ayant un carcinome. Un champ magnétique est alors focalisé sur la tumeur. La drogue est libérée par désorption lente, permettant une complète rémission en 15 jours. Ce type de procédé permet d'utiliser des quantités moins importantes de drogues, nocives pour les tissus sains.

Insérés dans des particules polymériques contenant une drogue, les grains magnétiques peuvent améliorer son taux de relargage. Sous un champ magnétique alternatif (0.5 – 1000 Gauss), les grains oscillent dans la matrice créant des contraintes au sein de la particule. Ils agissent comme des pompes qui excluent la drogue hors de la particule [Langer, 1990], [Sershen and West, 2002]. Ce principe a été utilisé in vivo pour délivrer de l'insuline à des rats diabétiques

⁷La trypsine est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine, Arginine) engage sa fonction acide. Elle est souvent utilisée pour digérer les protéines qui vont être analysées par spectrographie de masse.

[Kost et al., 1987].

Enfin, un dernier type d'application en thérapie concerne la destruction de cellules cancéreuses par "lyse cellulaire magnétique" [Halbreich et al., 2002]. Il a été constaté que l'application d'un champ magnétique haute fréquence permettait de tuer les cellules, phénomène parfois appelé "hyperthermie" [Bacri et al., 1997].

Notons que les particules magnétiques sont aussi connues pour être des agents de contraste en IRM⁸ [Pankhurst et al., 2003](Fig.1.6).

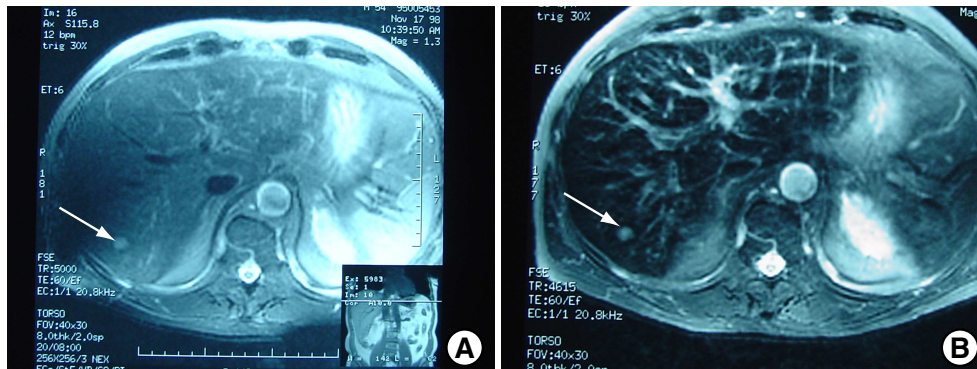


FIG. 1.6 – Clichés d'une métastase (flèche) dans un foie. A : avant injection, B : après injection intra-veineuse d'Endorem[®] (Laboratoire GUERBET, particules de 80 – 120 nm). L'Endorem[®] est capté par les macrophages du système réticulo-endothélial, principalement le foie (70% de la dose injectée). Son ajout permet de faire ressortir sur l'image le nodule métastatique par rapport aux tissus environnants : il apparaît plus contrasté (plus "clair") que sur l'image A, prise comme référence. Séquences réalisées avec une IRM de GENERAL ELECTRIC (1.5 teslas) en pondération T2. Clichés du Dr Laurent Tailboux et du Dr François Goubault. Scanner IRM Poitou-Charentes.

1.1.2 Utilisation dans les biotechnologies

Il s'agit ici également d'applications biomédicales mais elles sont en voie de développement, c'est pourquoi nous les avons distinguées des précédentes.

Test d'agglutination sous champ

Les tests d'agglutination représentent un des tests les plus utilisés en diagnostic (10^7 tests/an dans le monde). Des particules de latex, greffées avec des anticorps, sont mises en présence de l'échantillon à analyser (sang, urine). Si l'échantillon contient l'antigène complémentaire des anticorps présents sur les particules alors celles-ci s'agrègent. L'état d'agrégation est détecté par turbidimétrie.

⁸Imagerie par Résonance Magnétique

Les particules doivent être suffisamment stabilisées pour ne s'agréger qu'en présence de l'antigène. Les forces répulsives nécessaires à la stabilisation des particules ne doivent cependant pas écranter les interactions spécifiques (ligand/ récepteur) qui sont de faible portée (généralement inférieure à 1nm, [Leckband and Israelachvili, 2001]). Tout le savoir-faire repose sur la maîtrise de ces forces antagonistes. Le problème vient du fait que ce sont les mêmes paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, concentration de surfactants) qui régissent ces interactions. Actuellement, ces paramètres sont ajustés continuellement pour chaque nouveau lot de particules.

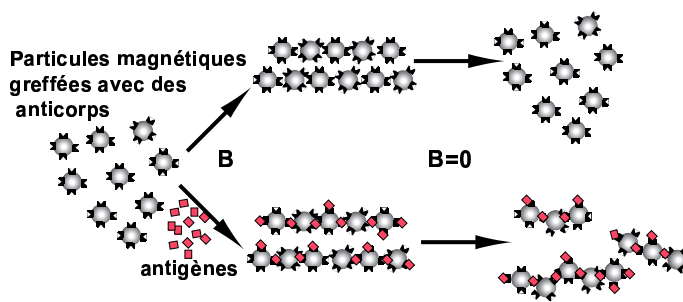


FIG. 1.7 – Principe du test d'agglutination sous champ : mises en présence d'un champ magnétique, des particules s'organisent sous forme de chaînes qui persistent en présence d'antigènes ou se redispersent sinon, lorsque le champ est annulé.

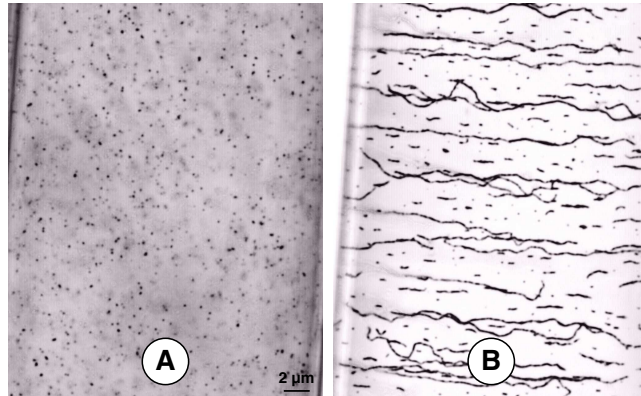
Si on confère à ces même particules des propriétés magnétiques alors l'application d'un champ magnétique crée une force attractive contrôlable entre les particules [Bibette et al., 2003] : elles s'organisent sous forme de chaînes sous l'effet d'interactions dipolaires entre les moments magnétiques (voir Chapitre 2). Lorsque le champ est annulé : (i) en l'absence d'antigènes, les particules se redispersent sous l'effet de l'agitation thermique ; (ii) en présence d'antigènes, les particules restent attachées (Fig.1.7 et Fig.1.8). La longueur des chaînes indique la concentration d'antigènes. Les premiers résultats montrent que la sensibilité des tests a été augmentée d'un facteur 1000. L'origine de cette amélioration n'est pas totalement comprise. Deux arguments sont avancés : (i) la force magnétique doit permettre de franchir la barrière répulsive d'énergie d'interaction (ii) le temps de mise en vis-à-vis des ligands et des récepteurs est contrôlé et est plus long que celui d'une simple collision brownienne [Baudry et al., 2004].

Les particules magnétiques doivent être *petites* (200nm – 300nm) pour avoir un mouvement brownien qui leur permet d'explorer tout l'échantillon mais surtout elles doivent être *extrêmement stables* car seule la présence d'antigène doit les faire s'agréger.

Différentiation par application d'une force en test immunologique

Les interactions non-spécifiques, par opposition aux interactions spécifiques de type ligand/récepteur, affectent la sensibilité des tests immunologiques.

FIG. 1.8 – Particules (ADEM-TECH, $200\text{ }\mu\text{m}$) greffées avec des IgG de lapin anti-Facteur de von Willebrand humain (VWF). A : en l'absence d'antigène, les particules se redispersent quand le champ magnétique est annulé; B : en présence de plasma contenant le vWF en forte quantité ($8\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), toutes les particules s'agrègent sous forme de chaînes après application d'un champ magnétique (70 mT pendant 5 min.).



[Lee et al., 2000] ont montré qu'avec un système adéquat ils pouvaient discriminer les interactions spécifiques et les non-spécifiques.

Les anticorps sont greffés sur des surfaces de poly(styrène) via un poly(éthylène glycol). La solution à analyser est ensuite ajoutée. Pour révéler la présence des antigènes, Lee *et al.* utilisent des anticorps attachés à des particules magnétiques. L'application d'un champ magnétique permet de retirer les anticorps liés de façon non spécifique avec la surface, comme le montre la Fig.1.9. Le traitement des surfaces (poly(styrène), particules magnétiques) est tel que la force à appliquer pour rompre un lien est plus forte lorsque le lien est spécifique que lorsqu'il est non-spécifique. La spécificité ainsi obtenue est supérieure à 99%.

Les particules magnétiques doivent être calibrées afin que la force appliquée soit la même d'une particule à l'autre. La surface des particules est recouverte de poly(éthylène glycol) afin que les interactions non-spécifiques soient plus faibles que les interactions spécifiques. La quantification des particules restantes peut se faire avec une camera CCD [Lee et al., 2000], un transducteur magnéto-résistif [Baselt et al., 1998] ou un capteur CMOS Hall [Aytur et al., 2002].

1.1.3 Utilisation en biophysique

Manipuler des molécules

Depuis une dizaine d'années la micro-manipulation d'une molécule unique est devenue possible grâce à l'apparition de nouveaux dispositifs, comme l'AFM (*Atomic Force Microscopy*) pour une gamme de force de $10 - 1000\text{ pN}$, les fibres de verres, les pinces optiques ($1 - 100\text{ pN}$), et les pinces magnétiques ($0.01 - 50\text{ pN}$).

L'énergie typique des phénomènes biologiques est donnée par l'agitation ther-

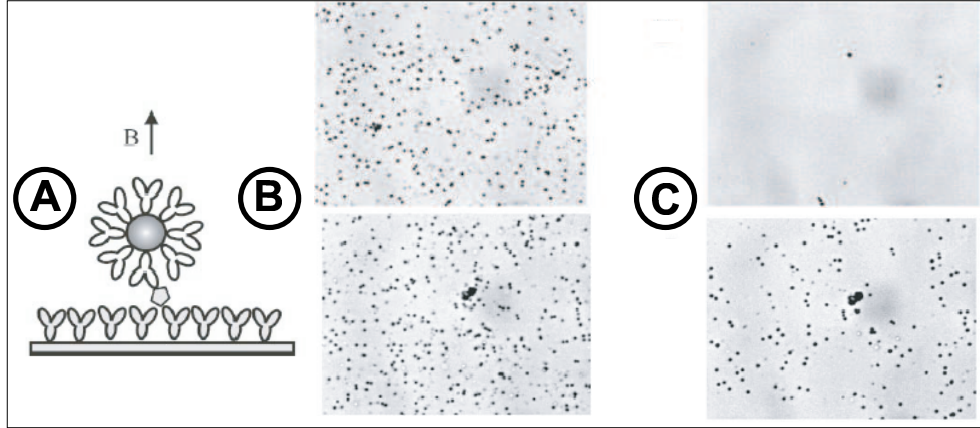


FIG. 1.9 – A : principe du montage de différentiation par application d’une force. B, C : tests avec 0 ng.mL^{-1} (en haut) et 0.1 ng.mL^{-1} (en bas) d’ovalbumine respectivement avant et après l’application du champ magnétique. Extrait de [Lee et al., 2000].

mique ($k_B T$) et la distance caractéristique est de l’ordre du nanomètre. Il a donc fallu être capable de mesurer et imposer des forces à l’échelle des bio-molécules soit $100 \text{ fN} - 10 \text{ pN}$, ce que les pinces magnétiques rendent possible.

Les premières manipulations d’objets magnétiques, pour des applications biologiques, remontent à 1949 pour l’étude *in vivo* des propriétés visco-élastiques du cytoplasme [Crick and Hughes, 1947]. Ont ensuite été construits des dispositifs capables de déplacer la particule magnétique [Amblard et al., 1996] et d’autres permettant la mesure de forces dans des membranes phospholipidiques sans pour autant manipuler les objets. Il fallut attendre 1996 pour combiner le déplacement 3D et la mesure de forces [Allemand et al., 1996].

Le principe du montage des pinces magnétiques (Fig.1.10) est le suivant : la molécule à étudier est attachée d’un côté à un substrat et de l’autre à une particule superparamagnétique⁹. Des électro-aimants produisent un gradient de champ qui crée une force sur la particule. Le courant circulant dans les électro-aimants permet d’ajuster l’intensité et la direction de la force appliquée. Un système d’acquisition vidéo permet le contrôle de la position 3D avec une précision de quelques nanomètres. Pour plus de détails concernant le dispositif se reporter à [Gosse and Croquette, 2002].

Les pinces magnétiques ont permis l’étude du comportement élastique

⁹On peut assimiler la molécule et la particule magnétique à un pendule animé d’un mouvement brownien. Cela peut être modélisé par une force aléatoire qui écarte le pendule de sa position d’équilibre vers laquelle il est ramené par la force de traction, F , exercée sur la molécule. Celle-ci s’exprime par : $F = kl$, avec $k = k_B T / \langle x^2 \rangle$ et l l’allongement de la molécule. $\langle x^2 \rangle$ correspond aux fluctuations quadratiques moyennes et peut être déterminé en suivant les déplacements de la bille en temps réel avec une caméra. l est mesuré en observant les anneaux de diffraction qui entourent la bille en éclairage parallèle.



FIG. 1.10 – Montage de pinces magnétiques : une molécule est attachée à un substrat par une de ses extrémités. L'autre extrémité est reliée à une particule magnétique qui permet sa manipulation par des aimants. Extrait de <http://e2phy.in2p3.fr/2002/actes/croquette.doc>

de l'ADN, du fonctionnement d'enzymes telles que les polymérases [Maier et al., 2000], les hélicases [Dessinges, 2002], les topoisomérases [Strick et al., 2000], la compaction de l'ADN en chromatine [Bancaud, 2004], les interactions ADN-RecA ainsi que la recombinaison homologue [Fulconis et al., 2004]. Elles permettent d'accéder à une gamme de forces relativement faibles et de travailler à force constante, ce que ne peuvent pas faire les pinces optiques. Cette technique est non-invasive, ce qui n'est pas le cas des pinces optiques pour lesquelles existe parfois un risque d'échauffement.

La taille de la particule (quantité d'oxyde de fer) doit être choisie en fonction de la gamme de forces dans laquelle on souhaite travailler. Une petite particule permet d'être plus résolutif dans la détermination de la position. De plus, si l'on souhaite soumettre la molécule à une torsion [Charvin et al., 2003], il faut que la particule tourne avec le champ magnétique : autrement dit, il faut que le moment magnétique soit couplé avec la particule afin que ce soit elle qui tourne pour aligner son moment dans la nouvelle direction du champ. Selon la nature des particules, le moment peut tourner à l'intérieur, ce qui empêcherait la particule de bouger (voir paragraphe 1.3).

Mesurer des forces colloïdales

Étudier les interactions entre colloïdes est d'un intérêt primordial pour comprendre les paramètres qui gouvernent la stabilité colloïdale.

Les méthodes connues de mesures de forces telles que l'appareil de force de surface (SFA), la microscopie à force atomique (AFM), la technique du plateau poreux (TFB), la microscopie à ondes évanescentes [Prieve, 1999] ne permettent pas la mesure directe des interactions entre particules colloïdales car au moins une

des surfaces mises en jeu est macroscopique et par conséquent plane à l'échelle colloïdale.

La *Magnetic Chaining Technique* (MCT) permet de mesurer directement les interactions entre deux particules colloïdales magnétiques [Leal-Calderon et al., 1994].

Soumises à un champ magnétique, les particules s'organisent sous forme de chaînes. L'espacement entre les particules dépend (i) de l'intensité du champ magnétique externe et (ii) de l'intensité des forces répulsives entre particules. Le système est analogue, en présence du champ magnétique, à un cristal unidimensionnel et diffracte la lumière à des longueurs d'onde de valeur déterminée par la condition de Bragg (Fig.54).

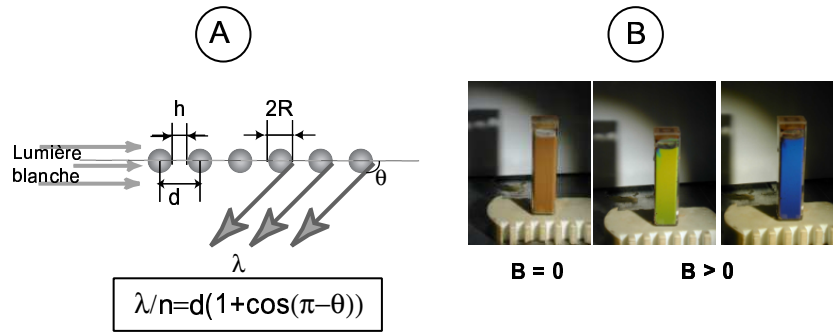


FIG. 1.11 – A : illustration de la diffraction de la lumière par une chaîne de particules ; B : émulsion magnétique soumise à différentes intensités du champ magnétique - Visualisation de la longueur d'onde : plus le champ magnétique est fort et plus les particules se rapprochent, l'onde diffractée passe ainsi du vert au bleu.

La distance finale entre particules résulte d'un équilibre entre les forces attractives (interactions magnétiques en présence d'un champ, interactions spécifiques, interactions Van der Waals,) et répulsives (électrostatiques, stériques). La distance d'équilibre est atteinte, à chaque incrémentation de la valeur du champ, quand la force répulsive compense exactement la force attractive. Mesurer, en fonction du champ appliqué, cette distance par diffraction de la lumière permet de construire le profil de la force de répulsion en fonction de la distance de séparation.

L'étude de forces induites par des polymères [Mondain-Monval et al., 1998], des protéines [Dimitrova and Leal-Calderon, 1999], ou des polyélectrolytes [Philip et al., 1999] a ainsi été effectuée.

Pour une bonne précision et une bonne reproductibilité, il faut des particules extrêmement calibrées. La taille des particules doit permettre l'observation dans le visible de la lumière diffractée, soit des particules de 100-300 nm de diamètre. Elles doivent par conséquent être fortement magnétiques pour que l'on puisse les aligner en utilisant des champs raisonnables (50-100 mT).

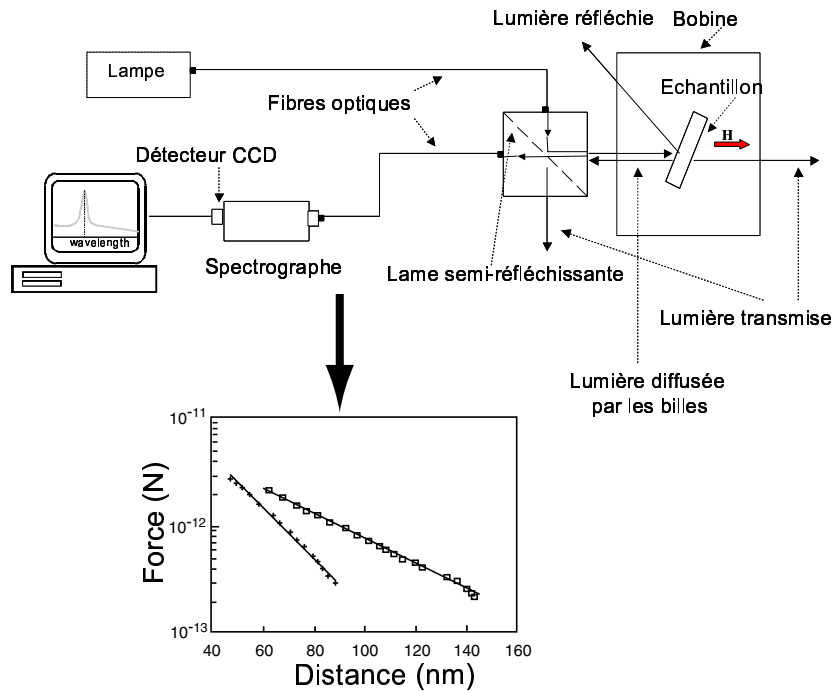


FIG. 1.12 – Montage et principe de la MCT (*Magnetic Chaining Technique*) : la lumière émise par une lampe à vapeur de xénon est acheminée vers l'échantillon via une fibre optique. L'échantillon est placé au cœur d'une bobine dont on peut faire varier l'intensité. La lumière rétrodiffusée par l'échantillon est ensuite analysée par un spectrographe constitué d'un détecteur CCD, d'un réseau et d'une carte interface logée sur un bus ISA de l'ordinateur qui fait l'acquisition et le traitement des données. Un miroir semi-réfléchissant permet de séparer le faisceau incident du faisceau rétro-diffusé. Exemple de profil de force obtenu : profil de forces pour des particules dans une solution de PAA (poly(acide acrylique)), NaCl 0.2 mol/L ; pH=3, + : PAA 100 000 g.mol⁻¹ □ : PAA 320 000 g.mol⁻¹

1.1.4 La microfluidique : un nouveau champ d'application

Un intérêt grandissant se porte vers une nouvelle génération de dispositifs, dits "laboratoires sur puces", qui visent à intégrer sur des supports de quelques centimètres carrés l'ensemble des processus nécessaires à l'analyse d'un produit [Ramsey, 1999].

Ces supports pouvant être préparés à faible coût [Wu et al., 2003] et en grande série à l'aide de techniques issues de la microélectronique, permettent également d'utiliser un volume faible d'échantillon (μL – mL) et conduisent à des temps de séparation extrêmement faibles.

Cependant, même si la pertinence de l'approche "micro-laboratoire" a déjà été démontrée dans divers domaines, de nombreuses difficultés propres à la microfluidique

dique restent non résolues. En effet, la transposition des méthodes conventionnelles à l'échelle du micron n'est pas sans poser problème. Dans des canaux gravés sur support miniaturisé, les pompages de fluide et les mélanges deviennent difficiles car les écoulements sont laminaires ; les faibles quantités de produit manipulées poussent souvent les techniques de détection (fluorescence, électrochimie) à leur limite.

Pour contrôler les écoulements et séparer les espèces à analyser, les particules magnétiques apportent leur contribution au développement de nouveaux outils (www.mic.dtu.dk/research/mems).

Citons quelques applications originales :

-Mélangeurs- Le mélange de fluides au sein de microcanaux est difficile en raison des écoulements à faible nombre de Reynolds. [Biswal and Gast, 2002] font tourner des chaînes magnétiques dans des microcanaux. Les chaînes sont constituées de particules magnétiques reliées entre elles par un polymère (bis-biotine- poly(éthylène glycol)). Elles sont insérées à l'intersection de canaux permettant d'introduire différentes solutions. Après rotation du champ magnétique, le mélange des solutions est constaté. Ce dispositif ouvre ainsi de nouvelles possibilités.

-Matrice de séparation- Organisées dans un canal, les particules magnétiques constituent une matrice de séparation régénérable, plus simple et plus rapide à mettre en œuvre que les plots gravés dans du silicium [Duke and Austin, 1997]. Cette matrice a été utilisée avec succès pour séparer de longs ADN par électrophorèse [Doyle et al., 2002]. Des séparations d'ADN longs de plusieurs dizaines de kilobases qui prenaient jusqu'à une nuit en champs pulsés dans l'agarose sont maintenant effectuées en quelques minutes. La raison d'une telle amélioration est un changement du mécanisme de migration (Fig.1.13) dû au passage d'un milieu d'électrophorèse dense et enchevêtré (le gel) à une matrice de colonnes beaucoup plus diluée.

-Support- Les particules magnétiques sont également utilisées comme support pour l'hybridation d'ADN [Fan et al., 1999], créant ainsi une variante des "puces à ADN". Des particules magnétiques greffées avec des oligonucléotides dits "sondes" sont immobilisées au sein d'un canal par un champ magnétique. Les ADN à analyser (ADN cibles), marqués avec un fluorophore, migrent à travers cette zone riche en particules et s'hybrident à leur complémentaire (Fig.1.14). L'analyse du signal fluorescent permet une analyse quantitative et qualitative de l'échantillon. Les auteurs montrent que le temps d'hybridation dans un tel dispositif est diminué et que la sensibilité est améliorée. Il faut tout de même noter que l'échantillon considéré est un système modèle, loin des échantillons couramment

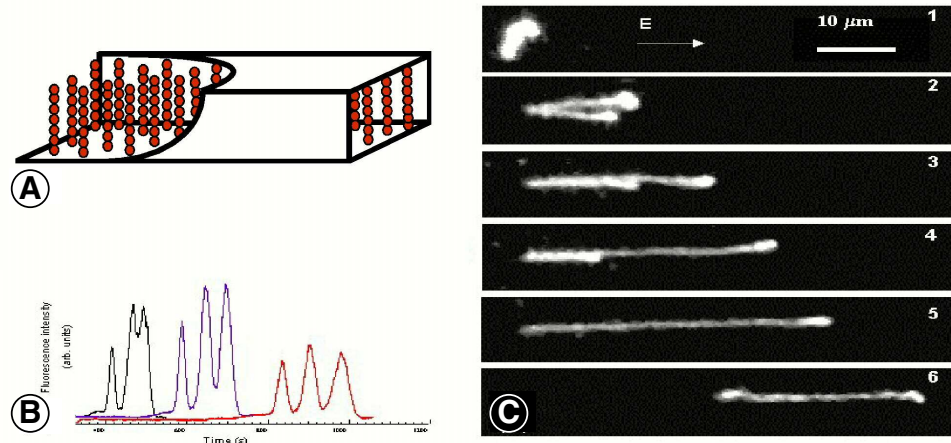


FIG. 1.13 – A : matrice de séparation constituée de particules magnétiques ; B : séparation d'ADN ; C : mécanisme de séparation : lors de la migration, les pelotes statistiques d'ADN percutent les colonnes du réseau et s'accrochent à elles pour former des boucles en “U” sous l'action du champ électrique. Ces boucles étant rarement symétriques, un mécanisme de désengagement semblable à celui d'une corde sur une poulie a ensuite lieu en un temps caractéristique de quelques secondes. Le temps de désengagement dépend de la taille de l'ADN, ce qui permet une séparation en taille.

analysés (puces Affimetrix). [Melnychuk and Harrison, 2002] utilisent le même principe pour la capture des ARNm¹⁰.

D'autres systèmes ont été développés sur ce principe de support : capture de protéines, digestion enzymatique [Guyon et al., 2003].

Les particules magnétiques doivent pouvoir être manipulées par un champ magnétique externe. Leur principale application est la capture d'objets biologiques (ADN, protéines, cellules,...) afin de les purifier, les concentrer, les détecter, les doser,...

Nous allons décrire les caractéristiques requises pour qu'une particule magnétique soit “efficace”, en termes de propriétés magnétiques et de capture.

¹⁰ Acide Désoxy-Ribonucléique messenger.

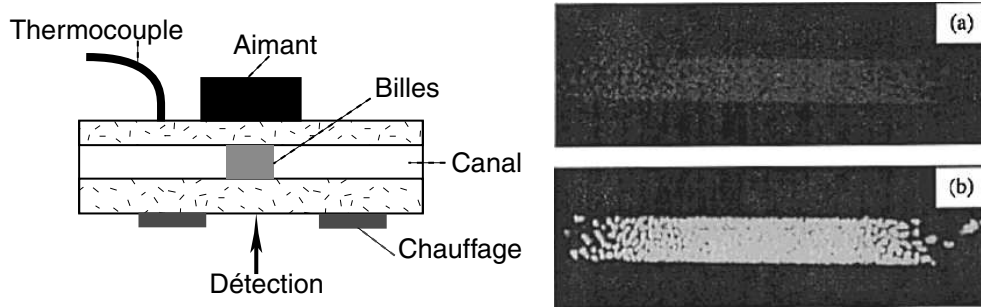


FIG. 1.14 – “Puces à ADN”. Coupe schématique du dispositif : un aimant permet l’immobilisation des particules magnétiques dans une zone du canal. Un thermocouple contrôle la température pour les réactions d’hybridation/déshybridation. Images : a) particules greffées avec des oligonucléotides sondes b) après hybridation avec les cibles. Extrait de [Fan et al., 1999].

1.2 Caractéristiques requises

1.2.1 Propriétés magnétiques

Les particules magnétiques sont des matériaux composites constitués d’une matrice organique¹¹ et de grains magnétiques¹². Nous allons souligner les caractéristiques (nature, taille) que les grains magnétiques doivent posséder afin de conférer à la particule un comportement *superparamagnétique*.

Propriétés magnétiques des particules Une particule constituée de grains ferro-¹³ ou ferrimagnétiques¹⁴ dispersés peut avoir un comportement *superparamagnétique* : elle répond comme un corps paramagnétique avec une valeur de susceptibilité magnétique χ beaucoup plus élevée que celle des corps les

¹¹La matrice peut également être minérale. Dans ce manuscrit, nous ne nous intéressons qu’au cas des particules constituées d’une matrice organique.

¹²Le terme “particule magnétique” qualifiera toujours un ensemble de grains magnétiques emprisonnés dans une matrice polymère.

¹³Dans un matériau ferromagnétique, les moments magnétiques de chaque atome s’alignent spontanément dans des régions appelées domaines de Weiss (délimités par des parois de Bloch) et cela même en l’absence de champ magnétique externe. En général, le moment magnétique total est nul parce que les différents domaines ont des orientations différentes et leurs effets s’annulent. Sous l’action d’un champ magnétique extérieur, les domaines vont tendre à s’orienter dans la direction du champ. Ce phénomène est irréversible. Lorsque le champ magnétique est annulé, le matériau présente une aimantation rémanente.

¹⁴Dans un matériau ferrimagnétique, deux moments magnétiques adjacents sont alignés mais dans des sens opposés. Le moment magnétique total n’est pas nul en l’absence de champ magnétique externe. Lorsque la somme des moments parallèles et anti-parallèles est nulle, on parle de matériau anti-ferromagnétique.

plus paramagnétiques¹⁵ ($\chi=3.10^{-3}$ pour $\text{Ho}(\text{NO}_3)_3$). Elle est de l'ordre de l'unité pour les colloïdes magnétiques. En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des grains sont orientés aléatoirement du fait de l'agitation thermique, ainsi aucun dipôle n'apparaît à l'échelle de la particule. Sous champ magnétique, tous les moments magnétiques s'orientent dans la direction du champ, conférant à la particule une forte aimantation.

Encapsuler des grains magnétiques au sein d'une particule confère à celle-ci une forte susceptibilité. L'aimantation répond alors plus fortement que des grains isolés à des champs magnétiques délivrés par de simples aimants.

Propriétés magnétiques des grains Les grains magnétiques contenus dans les particules font quelques nanomètres (5 – 50 nm). La dimension de ces grains est si petite qu'ils ne présentent qu'un *monodomaine magnétique*. Dans le cas d'oxydes de fer, la taille maximale d'un mono-domaine est de l'ordre de 20 nm.

En effet, un matériau magnétique massif possède une structure multi-domaines : il existe différentes régions d'aimantation variant en direction et en intensité, séparées par des parois dites parois de Bloch. Le matériau s'organise ainsi pour minimiser l'énergie magnétostatique totale. Si la taille du matériau diminue, la taille des domaines diminue et leur structure (ainsi que celle des parois de Bloch) peut changer. En dessous d'une certaine taille, de l'ordre de la centaine de nanomètres, un grain d'un matériau ferro- ou ferrimagnétique est un monodomaine magnétique, car la formation de parois entre les domaines de cette taille-là aurait un coût énergétique supérieur à l'énergie magnétostatique gagnée.

Des grains mono-domaines permettent une réponse plus rapide et plus forte que des grains multi-domaines pour lesquels l'énergie à fournir pour orienter les moments de chaque domaine est trop importante dans la gamme d'intensité de champs utilisés (10 – 50 mT). De plus, il est évident que l'ensemble des grains ne peut être remplacé par un matériau massif ferri-/ferromagnétique car les particules présenteraient alors une aimantation rémanente à champ nul, ce qui rendrait leur agrégation (due aux interactions dipolaires) irréversible.

Pour certaines directions du champ magnétique appliqué, l'aimantation d'un mono-domaine atteint la saturation beaucoup plus rapidement. Ces directions sont appelées *axes de facile aimantation* et dépendent de la géométrie des grains ainsi que du réseau cristallin. La différence de propriétés magnétiques suivant les directions de l'espace est qualifiée d'anisotropie magnétique.

Suivant la valeur de l'énergie d'anisotropie, E_a , par rapport à celle de l'énergie thermique, $k_B T$, les grains peuvent être ferro-/ferrimagnétiques ou superparamagnétiques.

¹⁵Dans un matériau paramagnétique, en l'absence de champ magnétique, les moments sont désordonnés et sans corrélation. Sous l'action d'un champ extérieur, les moments s'orientent dans la direction du champ. Ce phénomène est réversible.

Si $E_a > k_B T$, les grains sont ferri-, ferromagnétiques. Leur moment magnétique est orienté selon un axe dit de “facile aimantation”. Le moment magnétique est “bloqué” : le grain peut alors tourner dans un champ magnétique jusqu’à ce que son moment soit aligné avec le champ. Le *temps de relaxation brownienne* du grain τ_B est défini par : $\tau_B = \frac{3V_H\eta}{k_B T}$ où V_H est le volume hydrodynamique du grain, η la viscosité du milieu, k_B la constante de Boltzmann et T la température. Si $E_a < k_B T$, les grains sont superparamagnétiques : le moment magnétique peut fluctuer thermiquement, les spins étant toujours magnétiquement couplés. Cette propriété qu’ont les moments magnétiques des nanograins de se comporter comme les moments magnétiques des atomes d’un matériau paramagnétique a été découverte par Néel [Néel, 1949] et est appelée *superparamagnétisme* [Bean, 1955]. Le temps de rotation est appelé *temps de relaxation de Néel* τ_N : $\tau_N = \tau_0 \exp(E_a/k_B T)$, où E_a est l’énergie d’anisotropie, k_B la constante de Boltzmann, T la température. Le facteur pré-exponentiel τ_0 a pour ordre de grandeur 10^{-8} à 10^{-12} s.

Le temps de relaxation effectif d’un grain s’écrit : $\tau_{eff} = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N}$.

Généralement pour des petites particules, on a $\tau_B \gg \tau_N$. Ainsi, c’est le moment magnétique qui tourne à l’intérieur du grain. L’énergie d’anisotropie augmente avec le volume du grain. A partir d’une certaine taille de grains (telle que $\tau_B < \tau_N$), le moment magnétique est bloqué et c’est donc le grain qui tourne.

Le mécanisme de relaxation peut être identifié en étudiant la susceptibilité magnétique d’un milieu en réponse à un champ magnétique oscillant [Fannin, 1998].

Remarque – Relaxation à l’échelle d’une particule Nous avons vu que les temps de relaxation de Néel ou brownienne d’un grain isolé sont bien définis. Il est par contre peu aisé de caractériser ces temps de relaxation à l’échelle de la particule. Ces temps dépendent de la nature/forme des grains, de leur arrangement au sein de la particule (répartition, confinement) ainsi que de leur liberté de mouvement (figés ou non dans une matrice organique). Il est clair que ces temps dépendent des particules : de leur mode de fabrication, de leur forme et de leur taille. Connaître ces temps est pourtant primordial pour certaines applications comme les pinces magnétiques ou le diagnostic sous champ. Les pinces magnétiques reposent sur le principe que la particule tourne avec le champ magnétique afin d’exercer un couple sur la molécule étudiée. Dans le cas du diagnostic sous champ, ces temps vont permettre de régler la fréquence du champ magnétique à appliquer pour mettre en vis-à-vis les molécules de reconnaissance greffées sur des particules.

Les grains, contenus dans une particule, doivent être (i) ferro-, ferri- ou superparamagnétiques (ii) monodomaines et (iii) en quantité suffisante pour une réponse forte de la particule à un champ magnétique.

De plus, ils doivent rester dans la particule et ne pas être expulsés car celle-ci doit rester magnétique¹⁶. Leur encapsulation permet à la particule d'être bio-compatible [Häfeli and Pauer, 1999] car certains matériaux magnétiques comme le cobalt ou le nickel sont toxiques. Les oxydes de fer sont connus pour inhiber certaines enzymes, comme la polymérase, mais ne sont pas toxiques [Weissleder et al., 1967] : les cellules continuent à se diviser après les avoir endocytés [Wilhelm, 2002] et aucune mortalité n'est constatée chez des souris à qui on a injecté de la magnétite (1.5 g/kg) [Ibrahim et al., 1983].

Exemple des particules magnétiques de la société Ademtech Les particules magnétiques que nous avons utilisées, dans ce travail de thèse, proviennent de la société ADEMTECH. Nous cherchons actuellement à déterminer les temps de relaxation de Néel et de relaxation brownienne de ces particules par la méthode précédemment mentionnée¹⁷.

A partir de la courbe d'aimantation de l'extrait sec de ferrofluide χ_{FFsec} contenu dans les particules (Fig.1.15), nous pouvons déterminer la susceptibilité χ d'une particule qui s'écrit comme le rapport de l'aimantation M sur l'excitation magnétique H . χ_{FFsec} correspond donc à la pente de la courbe d'aimantation (de la partie linéaire). La concentration du ferrofluide contenu dans les particules¹⁸ est de 50% en volume. La susceptibilité du ferrofluide est donc $\chi_{FF} = \chi_{FFsec}/2$. Pour obtenir la susceptibilité de la particule il faut faire une correction liée à la forme sphérique de la particule : $\chi_{part} = \frac{\chi_{FF}}{1 + \chi_{FF}/3}$ soit $\chi_{part} = \frac{\chi_{FFsec}}{2 + \chi_{FFsec}/3} = 1.3$. La susceptibilité des particules que nous utilisons est de l'ordre de l'unité.

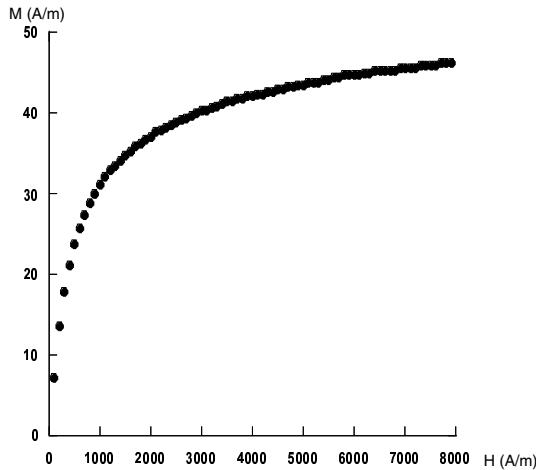


FIG. 1.15 – Courbe d'aimantation d'un extrait sec de ferrofluide fourni par la société ADEMTECH. Mesure du moment magnétique (M) en fonction de l'excitation magnétique (H) avec un SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) réalisée par Emanuel Bertrand (LCMD, ESPCI, Paris).

¹⁶Ceci peut sembler logique, mais certaines particules trouvées sur le marché deviennent moins magnétiques avec le temps en raison de la perte des grains d'oxyde.

¹⁷Travail mené par Laetitia Cohen-Tannoudji (LCMD, ESPCI, Paris) en collaboration avec le professeur P. Fannin (Trinity College, Dublin, Irlande).

¹⁸L'oxyde présent est la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\rho=5.07 \text{ g.cm}^{-3}$).

1.2.2 Taille et distribution

L'utilisation que l'on souhaite faire des particules détermine le choix de leur taille (voir le paragraphe 1.3 : mesure de forces colloïdales par la MCT).

Pour capturer des objets, des particules de quelques microns permettent une séparation rapide. Toutefois, celles-ci sédimentent rapidement ($2 \mu\text{m.s}^{-1}$ pour une sphère de rayon $1 \mu\text{m}$), il faut alors maintenir l'échantillon sous agitation.

Pour les tests immunologiques, des petites particules browniennes sont plus appropriées pour l'exploration de la totalité le volume de l'échantillon et/ou favoriser le nombre de collisions. Elles doivent, dans ce cas, contenir beaucoup d'oxyde, pour réagir rapidement à un champ magnétique, ce qui est difficile à obtenir.

De même, quand les particules sont utilisées comme support solide, il vaut mieux qu'elles soient petites pour offrir une plus grande surface spécifique.

Une uniformité en taille (Fig.1.16) implique une bonne reproductibilité, une meilleure homogénéité du phénomène mis en œuvre (capture, séparation) et surtout permet de faire des études quantitatives. Elle est notamment indispensable dans les applications présentées précédemment comme la différenciation par application d'une force (les particules doivent être calibrées (i) pour que la force appliquée soit la même d'une particule à une autre (ii) pour quantifier les particules restantes) ou la mesure de forces colloïdales par la MCT. Le travail présenté au Chapitre 3 nécessite également des particules calibrées.

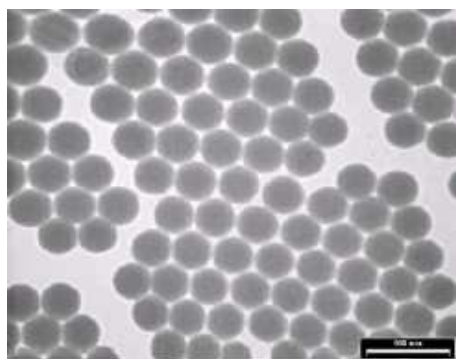


FIG. 1.16 – Adembeads : homogénéité en taille - Cliché TEM par M. Gaboyard - ADEMTECH- Barre d'échelle : 500 nm.

1.2.3 Surface

C'est la surface de la particule qui gouverne (i) la stabilité colloïdale et (ii) la capture d'une molécule qui peut se faire par adsorption ou par interactions spécifiques (ligand/récepteur).

Stabilité colloïdale

Un échantillon de particules magnétiques se présente sous la forme de particules dispersées dans une phase continue (généralement aqueuse). Il convient de conserver cet état dispersé et d'éviter toute agrégation (réversible ou irréversible) des particules (Fig.2.13). Lorsque les particules s'agrègent, l'échantillon perd son homogénéité (sédimentation). Une autre conséquence de l'agrégation est la réduction de la surface spécifique. Ceci peut être gênant quand les particules sont utilisées comme support solide.

Les interactions entre particules régissent la stabilité d'une dispersion colloïdale. A cet égard, la théorie la plus simple est celle dite DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek, voir par exemple [Israelachvili, 1985]). Elle prend en compte les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives d'origine électrostatique.

FIG. 1.17 – Illustration du phénomène d'agrégation. L'échantillon n'est alors plus homogène et la surface spécifique diminue. Cliché C.G.



Les particules magnétiques doivent être stables dans leur solution de stockage mais elles doivent conserver cette stabilité lorsqu'on les place dans des milieux biologiques (tampons, sang, urine...). Ces milieux sont salins et contiennent bon nombre de protéines qui modifient les portées des interactions. L'adsorption (volontaire ou non) et le greffage covalent de protéines modifient la charge de surface de la particule, ce qui joue sur sa stabilité. Connaître le point isoélectrique des protéines présentes à la surface des particules permet de mieux maîtriser les interactions électrostatiques mais il faut généralement introduire d'autres types de forces répulsives.

Il existe beaucoup d'autres forces qui jouent sur la stabilité colloïdale. Peuvent ainsi intervenir des forces attractives de déplétion, quand sont en présence des objets de tailles très différentes, des forces de solvation, ou encore des forces induites par des macromolécules greffées ou adsorbées.

Les forces, qui vont introduire une composante répulsive, sont des forces d'ori-

gine stérique dues à la présence de macromolécules à la surface des objets¹⁹.

La présence de polymères à la surface de la particule peut donc permettre d'ajouter une force répulsive qui va éviter l'agrégation des particules entre elles. La couche de polymère évite également l'adsorption de protéines. Les polymères les plus utilisés sont les poly(éthylène glycol) (PEG).

Les tests d'agglutination sous champ (voir Chapitre 1.1.2) sont une des applications pour lesquelles la maîtrise des interactions est primordiale au point d'éviter toute agrégation, y compris entre deux particules (l'agrégation est synonyme de présence d'antigènes dans le cas des tests d'agglutination).

Capture par adsorption

L'adsorption d'une molécule (protéine, ADN, ARN) à la surface est gouvernée par des interactions (i) de Van der Waals (attractives) (ii) électrostatiques (répulsives), (iii) hydrophobes (attractives).

L'adsorption d'ADN est plutôt régie par les interactions électrostatiques. On va ainsi utiliser des particules cationiques pour capturer l'ADN en milieu acide et le relâcher en milieu basique [Elaïssari et al., 1998].

L'adsorption de protéines est due à des interactions hydrophobes. Il faut donc être capable de fabriquer des particules dont on peut faire varier l'hydrophobicité pour capturer puis relarguer les protéines, ce que permettent les polymères à LCST²⁰, comme le poly(NIPAM). La variation de la température modifie l'hydrophobicité de la particule. Ainsi pour une température supérieure à la LCST, la protéine va s'adsorber sur la particule. Lorsque la température devient inférieure à la LCST, la protéine se désorbe [Elaïssari and Bourrel, 2001].

Des précautions sont cependant à prendre suivant l'utilisation que l'on veut faire de la protéine après capture. Il a en effet été montré que des particules

¹⁹Lorsque des particules, recouvertes de polymères, se rapprochent, les chaînes polymériques s'interpénètrent. Différents phénomènes peuvent se produire selon la nature de la phase continue et la concentration en polymères :

- *si les chaînes sont en bon solvant dans la phase continue* : la perte d'entropie des chaînes induite par le confinement entraîne une répulsion entre les particules. La force répulsive est de la forme $F(d) = F_0 \exp(-d/R_g)$, d étant la distance entre les particules et R_g le rayon de giration du polymère. Les forces entre colloïdes induites par des polymères ont été étudiées expérimentalement par le groupe de J. Bibette [Mondain-Monval et al., 1998][Omarjee, 1999] ;
- *s'il y a très peu de polymères* et que la surface des particules est peu recouverte, un phénomène de pontage peut se produire. Ainsi, une même chaîne de polymère peut s'adsorber sur deux particules à la fois et conduire à leur agrégation irréversible ;
- *si les chaînes sont en mauvais solvant dans la phase continue* : les interactions chaînes-chaînes étant plus favorables que les interactions chaînes-solvant, il apparaît une force attractive entre les couches adsorbées.

²⁰Low Critical Solution Temperature

hydrophobes pouvaient dénaturer les protéines et conduire à leur adsorption irréversible. Le développement de particules hydrophiles est d'un grand intérêt : (i) le contrôle de l'adsorption se fait par le pH et la salinité du milieu ; (ii) la protéine n'est pas dénaturée [Veyret et al., 2003].

Il faut également noter que les tensio-actifs, qui stabilisent les particules, affectent l'adsorption des objets biologiques [Ganachaud et al., 1997].

Capture par interactions spécifiques

Ce type de capture nécessite le greffage sur la particule magnétique d'une protéine ou anticorps²¹ qui va spécifiquement reconnaître l'objet souhaité. Différentes réactions de couplage anticorps/particule peuvent être utilisées [Hermanson, 1996]. Les plus courantes font intervenir les fonctions carboxyles et amines pour donner des liaisons peptidiques (-CO-NH). Le couplage anticorps/particule peut également se faire par simple adsorption.

Toute la difficulté se résume à accrocher la bonne quantité de protéines de la bonne façon [Vikholm and Albers, 1998]. Les paramètres importants, sur lesquels nous allons nous arrêter, sont (i) l'orientation de l'anticorps, (ii) la densité d'anticorps greffés (ii) le rôle d'un bras espaceur.

Orientation de l'anticorps

Pour qu'un anticorps soit fonctionnel, il faut qu'il soit orienté [Peluso et al., 2003]. La structure d'une IgG²² est schématisée Fig.43, elle peut être assimilée à un "Y" dont seules les deux extrémités peuvent se lier à l'antigène. La "queue du Y" est appelée *fragment Fc* et les deux "bras du Y" sont appelés *fragments F(ab)*²³ (L'ensemble des deux fragments F(ab), liés par des ponts disulfures, est appelé fragment F(ab')₂ Fig.43).

Comme son nom l'indique, le fragment F(ab) est la partie qui se lie aux antigènes. Si l'on souhaite que l'anticorps soit fonctionnel, il faut donc qu'elle soit orientée vers l'extérieur. L'anticorps doit par conséquent être greffé par sa partie Fc.

Un anticorps, comme toute protéine, est constitué d'acides aminés. Ceux qui permettent le greffage, via leurs fonctions amines, sont l'arginine et la lysine. Rien ne permet de distinguer de façon réactionnelle la partie Fc de la F(ab) car ces acides aminés sont répartis dans tout l'anticorps.

Le seul moyen d'orienter l'anticorps est d'utiliser le fait que le fragment Fc peut porter des sucres. Cette partie, plutôt hydrophile [Esser, 1997], s'adsorbera préférentiellement sur des surfaces de même type. Une oxydation des sucres avec du périodate de sodium (NaIO₄) permet une fixation covalente et orientée de l'anticorps sur des surfaces aminées à l'aide d'un composé bis-hydrazide

²¹Encore appelé immunoglobuline, un anticorps est une protéine fabriquée par des cellules chargées des réactions immunitaires et dirigée de façon spécifique contre un antigène.

²²Immunoglobuline G, classe d'anticorps la plus commune (90%)

²³Fab : *fragment antigen binding*, Fc : fragment cristallisable.

[Bílková et al., 1999] [Qian et al., 1999].

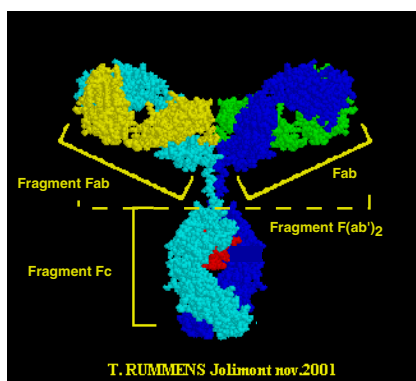


FIG. 1.18 – Structure d'une IgG : une partie constante appelée fragment F_c , et deux parties qui se lient à l'antigène, fragment $F(ab)$. L'ensemble des deux fragments $F(ab)$, liés par des ponts disulfures, est appelé fragment $F(ab')_2$.

En règle générale, ces méthodes sont peu exploitées car elles nécessitent la connaissance de la séquence en acides aminés de l'anticorps. On préfère utiliser une fixation a priori non orientée en essayant de jouer sur l'hydrophobicité des particules, le pH et la salinité de la phase continue pour favoriser l'orientation. Ainsi [Chen et al., 2003] ont montré qu'à faible force ionique (2.1 mM PBS, 0.3 mM NaCl), des IgG (classe 1 et 2a) étaient mieux orientés quand ils étaient adsorbés sur des surfaces aminées que des surfaces carboxylées car le pI^{24} de la partie F_c est inférieur à celui de la partie $F(ab)$.

Les particules vendues à cet effet sont des particules avec des fonctions carboxyliques (couplage avec $R-NH_2$ via un carbodiimide), amines (couplage avec $R-NH_2$ via du glutaraldéhyde) mais également époxy (couplage à pH neutre sans activation), tosyls, thiols etc...

Densité d'anticorps

La quantité d'anticorps est un facteur important. Saturer la surface d'une particule n'est parfois pas la bonne méthode : (i) les anticorps sont généralement peu chargés dans les solutions biologiques, leur pI étant autour de 7-8. Une monocouche d'anticorps tend à déstabiliser les particules car leur charge de surface est diminuée, (ii) si les anticorps sont trop serrés, les antigènes ne vont pas pouvoir se lier correctement pour cause de gêne stérique [Spitzanel and Clark, 1993], [Wheatley, 1991].

Bras espaceur

L'utilisation d'un bras espaceur, entre l'anticorps et la particule, donne une certaine liberté de mouvement à l'anticorps qui peut alors s'orienter pour se lier correctement [Hinterdorfer et al., 1996]. Le bras espaceur généralement utilisé est un PEG dont la masse moléculaire varie entre $M_W=400 \text{ g.mol}^{-1}$ [Suzuki et al., 1995] et $M_W=3400 \text{ g.mol}^{-1}$ [Weimer et al., 2000].

²⁴Point Isoélectrique.

On trouve sur le marché nombre de particules préalablement fonctionnalisées :

- avec l’anticorps d’intérêt (seulement si la substance à capturer est “classique” *i.e.* Dynabeads® CD19 de chez DYNAL pour la capture des Lymphocytes T) ;
- avec un intermédiaire permettant de fixer l’anticorps de façon orientée et un peu plus loin de la surface (liberté de mouvement). Cet intermédiaire peut être un anticorps secondaire type anti-souris, anti-lapin (pour la fixation d’un anticorps de souris ou de lapin), des protéines qui fixent les anticorps par leur partie Fc (protéine A ou protéine G).

La capture d’ADN ou d’ARN peut également se faire de façon spécifique. On greffe alors sur la particule un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire d’une partie de l’ADN d’intérêt (pour la capture des ARNm on greffe une séquence de 25 Thymines car les ARN contiennent généralement une séquence polyAdénine). Le même travail d’optimisation de la densité d’oligonucléotides et de longueur du spacer doit être entrepris [Guo et al., 1994], [Shchepinov et al., 1997].

Interactions non-spécifiques

Les études sur l’adsorption non spécifique de protéines ont été stimulées par le désir d’obtenir des objets immunologiquement “furtifs” : il faut éviter que des implants soient reconnus comme corps étrangers ou que des opsonines²⁵ ne s’adsorbent sur des vecteurs de médicaments et déclenchent une réponse immunitaire (phagocytose).

Dans les cas des particules, des protéines adsorbées de façon non-spécifique peuvent (i) perturber la stabilité colloïdale ; (ii) polluer la capture d’une espèce ; (iii) réduire la sensibilité d’un test immunologique [Lee et al., 2000].

Divers essais ont été effectués [Klein, 1989] démontrant que la solution la plus efficace est l’utilisation de PEG (polyéthylène glycol), greffés par une de leurs extrémités plutôt qu’adsorbés aléatoirement. [Jeon and Andrade, 1991] [Jeon et al., 1991] ont proposé un modèle qui a servi de base aux expériences [Huang et al., 1996]. Il a été établi que (i) pour résister à l’adsorption, la concentration en PEG doit diminuer si la taille de la protéine augmente ; (ii) une densité trop importante de PEG (proche de l’état cristallin) ne résistait pas à l’adsorption de protéines. Sur des mono-couches auto-assemblées de silanes [Prime and Whitesides, 1991], il a été montré que l’adsorption non-spécifique diminuait lorsque la longueur des chaînes PEG augmentait [Prime and Whitesides, 1993].

²⁵Protéines (fragments Fc d’une IgG, fibronectines, éléments du complément) qui constituent un signal moléculaire pour l’organisme, indiquant aux cellules immunitaires la présence d’un corps étranger. Il y a reconnaissance des opsonines adsorbées en surface par les cellules macrophagiques, localisées dans le foie, la rate et la moelle.

Les PEG servent donc aussi bien comme *bras espaceurs* pour favoriser l'hybridation ligand/récepteur que comme *barrière répulsive* pour empêcher l'adsorption non-spécifique [Huang et al., 1996]. En mélangeant des PEG fonctionnalisés différemment, on peut également contrôler la quantité de protéines greffées [Perret et al., 2002].

Une autre solution consiste à adsorber sur les surfaces des protéines comme la BSA (*Bovine Serum Albumin*) ou la caséine. Il est alors difficile pour une protéine de déplacer ces dernières pour venir s'adsorber.

1.3 Préparation

Les paramètres importants lors du “design” d'une particule sont (i) sa taille (ainsi que la distribution de taille), (ii) la quantité d'oxyde qu'elle contient, (iii) la nature de sa surface et (iv) les groupes réactifs qu'elle porte.

De nombreuses voies de synthèse ont été développées et continuent d'être optimisées. Le but est d'atteindre les caractéristiques citées précédemment mais également d'obtenir un procédé reproductible et de faible coût.

Ces différents procédés peuvent être répartis en trois catégories selon que :

- les grains magnétiques et la matrice sont synthétisés séparément ;
- les grains magnétiques sont synthétisés au contact de la matrice ;
- la matrice est synthétisée en présence des grains d'oxydes.

Cette partie a été largement inspirée de l'ouvrage de A. Elaïssari [Elaïssari, 2003] : le lecteur pourra s'y référer pour de plus amples détails.

Le procédé correspondant aux particules que nous utilisons est décrit au paragraphe 1.3.4

Les différents procédés conduisent à l'obtention de trois types de particules²⁶ (Fig.1.19) :

- un système cœur/couronne avec un cœur de grains magnétiques ;
- des grains répartis de façon homogène dans la matrice ;
- une couche de grains magnétiques autour de la particule.

Ce système est le moins satisfaisant car les grains d'oxyde ont tendance à partir en solution.

Avant de détailler les trois principales voies de synthèse des particules magnétiques, nous allons décrire comment obtenir les grains magnétiques qui sont le plus souvent composés d'oxydes de fer.

²⁶Attention, il ne faut pas associer une voie de synthèse à un type de particules : les trois types de particules peuvent être obtenus avec la même voie de synthèse suivant le protocole utilisé.

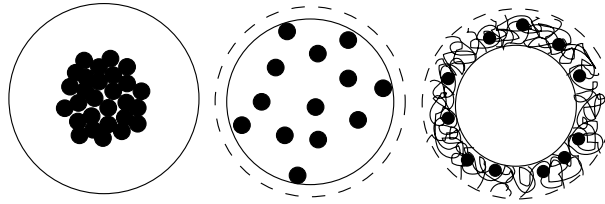


FIG. 1.19 – Différents types de particules magnétiques : un système coeur/couronne avec un coeur de grains magnétiques, des grains répartis de façon homogène dans la matrice, une couche de grains magnétiques autour de la particule.

1.3.1 Ferrofluides

La synthèse de grains ferro-, ferrimagnétiques monodomaines est primordiale (voir paragraphe 1.2). Nous en présentons maintenant les principes.

Les ferrofluides sont des fluides magnétiques, aussi bien aqueux qu'organiques, constitués de nanoparticules d'oxydes de fer ou ferrites (diamètre < 10 nm). Les ferrites les plus couramment rencontrées sont la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Deux types de synthèse sont principalement utilisés :

le broyage jusqu'à l'obtention de nanoparticules qui sont ensuite dispersées dans un fluide contenant un surfactant. Ce dernier s'adsorbe sur les particules et les stabilise [Papell, 1965], [Roseinsweig, 1975] ;

la précipitation en milieu basique d'une solution d'ions métalliques [Elmore, 1938] : les ions d'une solution de chlorures de fer [Khalafalla and Reimers, 1973] ou de sulfates de fer [Shinkai et al., 1991] [Shimoiizaka et al., 1976] précipitent par ajout de soude ou d'ammoniac. De l'acide oléique est ensuite introduit : il rend la surface des particules hydrophobe ce qui conduit à leur agrégation. On peut alors les transférer dans un fluide organique [Khalafalla and G.W., 1980] ou alors ajouter un tensio-actif fortement hydrophile (Dodecyl Sulfate de Sodium ou SDS) et obtenir ainsi un ferrofluide aqueux.

En 1980, Massart [Massart, 1980] proposa une voie de synthèse ne nécessitant pas l'utilisation de surfactant qui a inspiré nombre de synthèses de ferrofluides ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [Jolivet and Tronc, 1988] [Prené, 1995], $\text{ZnNiFe}_2\text{O}_4$ [Zins et al., 1999], MnFe_2O_4 [Lacava, 1999].

Le rapport ions ferreux/ferriques, le pH, la nature et la concentration de la base ainsi que la température gouvernent la taille et la quantité d'oxydes obtenus [Massart and Cabuil, 1987].

L'oxyde obtenu peut être caractérisé par microscopie électronique, spectroscopies Rayons X, Infra-Rouge ou Mössbauer²⁷, analyse thermogravimétrique ou dosages chimiques [Montagne et al., 2002].

²⁷Spectroscopie de résonance nucléaire

La ferrite majoritairement présente est la maghémite. Elle ne peut être synthétisée directement car l'alcalisation et l'hydrolyse d'ions Fe^{III} conduisent à des ferrihydrites qui se transforment en goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$) et hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Il faut donc d'abord obtenir de la magnétite (Fe_3O_4) par la voie de co-précipitation des ions ferriques et ferreux (en proportions stoechiométriques [Elmore, 1938]). La magnétite est très réactive vis à vis de l'oxydation et se convertit rapidement en maghémite. Celle-ci contient des lacunes et peut, par traitement thermique, se transformer en hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), variété la plus stable thermodynamiquement. L'adsorption d'espèces thermiquement stables permet de retarder ce frittage [Prené, 1995].

1.3.2 Grains d'oxydes et matrice synthétisés séparément

Imprégnation

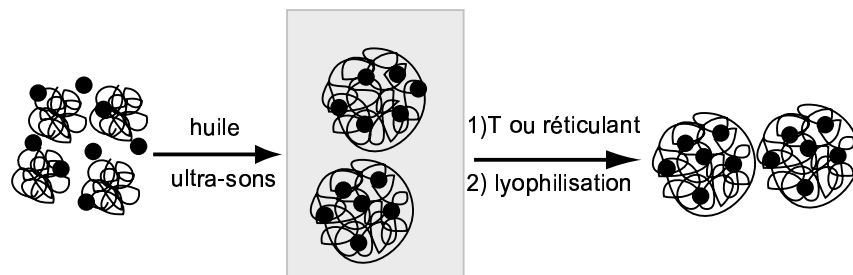


FIG. 1.20 – Processus par imprégnation : le polymère est émulsionné en présence des grains d'oxyde. La matrice est solidifiée par un traitement thermique ou par ajout d'un agent réticulant. Les particules sont ensuite lyophilisées pour conservation.

Le premier procédé consiste à émulsionner avec des ultra-sons une phase aqueuse contenant de l'albumine et de l'oxyde de fer dans une phase organique (huile minérale). La matrice est ensuite durcie par un traitement thermique ou par ajout d'agents réticulants.

En ajustant les paramètres tels que l'agitation et la quantité de monomères, deux types de particules peuvent être obtenues (i) des particules de $1\ \mu\text{m}$ contenant 20 à 50 % en masse de Fe_3O_4 [Widder et al., 1979] [Senyei et al., 1978] (ii) des particules de 200 - 500 nm (avec une large distribution) contenant 5 à 9 % de Fe_3O_4 [Kandzia et al., 1984].

Les groupements carboxyliques et aminés de l'albumine permettent le greffage de molécules biologiques. Ces particules sont biocompatibles et l'adsorption non-spécifique de protéines est importante. Pour limiter cette dernière, l'albumine a été remplacée par du PVA (poly vinyl alcool) [Müller-Schulte et al., 1997].

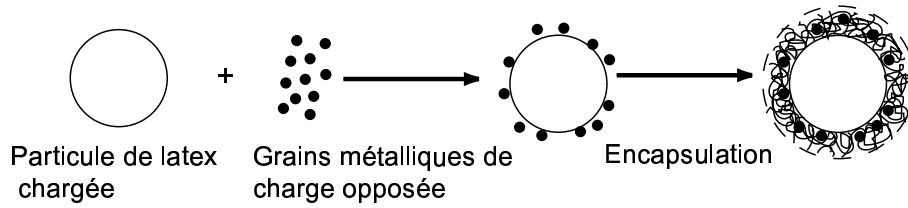


FIG. 1.21 – Processus de Furusawa basé sur le principe d'hétéro-coagulation, en 2 étapes (i) adsorption électrostatique de grains métalliques sur des sphères de latex (ii) encapsulation dans une couche de polymère protectrice

Procédé Furusawa

Ce procédé, connu sous le nom de son inventeur [Furusawa et al., 1994], repose sur le mélange de sphères de polystyrène chargées négativement (présence de groupements sulfates et carboxyliques) avec des particules métalliques cationiques. Par interactions électrostatiques, celles-ci s'adsorbent sur les sphères (40% en volume). Ce phénomène est appelé hétérocoagulation ou adsorption multicouches.

Pour éviter la désorption des grains métalliques ainsi que leur contact avec des bio-molécules, une fine couche de polymère encapsule le tout (généralement du poly(NIPAM)) (Fig.1.21).

Les particules de la société SERADYN sont produites suivant ce type de procédé. Sur un cliché de TEM²⁸ montrant ces particules (Fig.1.22), on observe un cœur de latex blanc entouré d'un gel magnétique. Le gel s'est désorbé suite au séchage et à la mise sous vide nécessaires à l'observation. Ce procédé est simple à mettre en œuvre et donne des particules bien calibrées, qui ne sont cependant pas sphériques à cause de la répartition non homogène des grains métalliques.

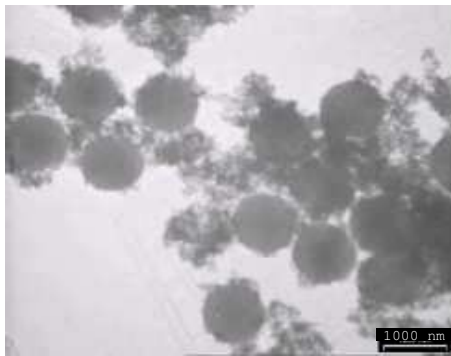


FIG. 1.22 – Particules SERADYN : un gel magnétique est adsorbé sur un cœur de latex. Clichés de TEM par Manuel Gaboyard - ADEMTECH.

²⁸Microscopie Electronique à Transmission

Encapsulation

Ici, les grains d'oxydes sont mis en présence d'un polymère hydrophile comme, par exemple, le poly(acide acrylique) [Shimomura et al., 1996] ou le poly(méthyl méthacrylate) [Nakamae et al., 1993]. Il est adsorbé ou greffé sur les grains donnant ainsi des particules de 200 à 400 nm.

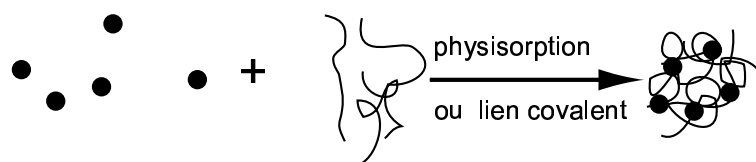


FIG. 1.23 – Processus par encapsulation : le polymère s'adsorbe ou est couplé aux grains d'oxyde

Sur le même principe, du poly(éthylène) (ayant l'aspect de cire) est émulsionné (ultra-sonication) à chaud avec des grains de maghémite puis le tout subit une trempe donnant ainsi des particules magnétiques de toutes formes [Chatterjee et al., 2002] et toutes tailles (50 – 500 nm de diamètre).

1.3.3 Grains synthétisés au contact de la matrice

Ces procédés reposent sur le savoir-faire concernant l'obtention de particules de latex "blancs" (non magnétiques). Depuis les années 1950, on sait obtenir des particules extrêmement calibrées, de CV 5%²⁹ (Fig.1.25), dans une large gamme de taille. A la fin des années 1970, elles furent proposées par Dow Chemical et Pechiney-Saint Gobain à des fins biomédicales [Hager, 1974]. Des latex marqués, fluorescents ou radioactifs ont ainsi été développés. Une idée naturelle a été d'ajouter des propriétés magnétiques à ces objets en vue de leur manipulation.

On obtient des latex magnétiques en dispersant des latex fonctionnalisés dans une solution de sels métalliques : les grains magnétiques se forment alors dans les particules par précipitation.

Par précipitation

Fort de son expérience sur les latex blancs [Ugelstad et al., 1974], J. Ugelstad est devenu un des pionniers de la fabrication de latex magnétiques. Il a alors fondé la société DYNAL en 1986 qui commercialise actuellement les particules magnétiques les plus abouties.

Le procédé est basé sur l'obtention de latex poreux (Fig.2.4), de grande taille (2-4 μm) avec une étroite distribution de taille (CV<3%).

²⁹CV : coefficient de variation

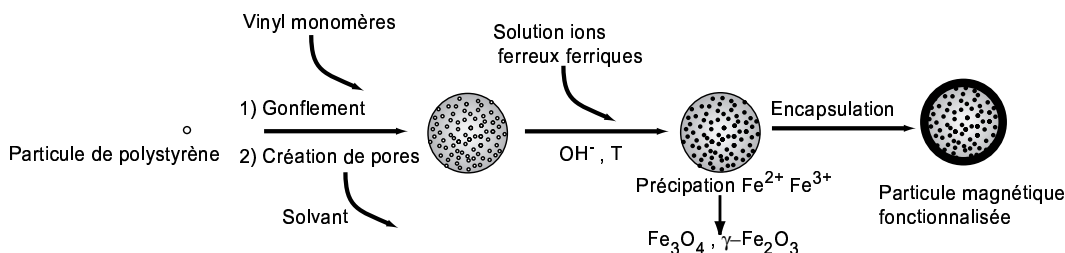


FIG. 1.24 – Processus d’obtention de latex poreux magnétiques. Procédé DYNAL.

Des latex ($0.5 \mu\text{m}$) peuvent absorber un composé A et gonfler pour atteindre jusqu’à 1000 fois leur volume initial, lorsqu’ils sont activés par ajout d’un petit composé B insoluble dans l’eau (hexadecane ou dioctanyl peroxide), contre 1 à 5 fois en temps normal [Ugelstad and Mork, 1980]. La présence d’un petit composé augmente l’entropie de mélange du composé A avec ceux de la particule lorsque B reste à l’intérieur car il est non miscible avec l’eau.

Des particules “graines” contenant B sont mélangées avec des monomères de vinyl ainsi que d’autres réactifs comme, par exemple, des agents porogènes (composés A). Les monomères de vinyl diffusent alors à l’intérieur de ces latex activés. Après adsorption de A, la température est augmentée permettant ainsi la polymérisation de la particule.

L’évaporation de l’agent porogène (un solvant volatil n’intervenant pas dans la polymérisation) conduit à l’obtention de latex poreux. On les traite ensuite chimiquement afin qu’ils portent des groupes oxydants.

Les particules sont séchées puis mises dans une solution contenant des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} dans les proportions conduisant à l’obtention de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et Fe_3O_4 . Par ajout d’une base et augmentation de la température, les ions métalliques précipitent au contact des fonctions oxydantes à l’intérieur des pores. Reste ensuite à encapsuler le tout en effectuant une seconde polymérisation qui va permettre également de fonctionnaliser les particules (de 1 à $5 \mu\text{m}$ avec fonctions carboxyles, époxy, amines, thysils avec une distribution de taille de $\text{CV} < 3\%$ et un taux d’oxyde de 15 à 40 % en masse)[Ugelstad et al., 1993].

Bien que long, compliqué et coûteux, ce procédé permet l’obtention de particules extrêmement calibrées et stables.

D’autres procédés similaires ont été développés [Winnik et al., 1995], [Rembaum et al., 1980].

Autres voies

Une autre méthode a été développée par Rhône-Poulenc en 1989 [Charmot, 1989]. Des sphères de latex calibrées subissent une étape de polymérisation supplémentaire dans du toluène. Du carbonyl de cobalt ($\text{Co}_2(\text{CO})_8$)

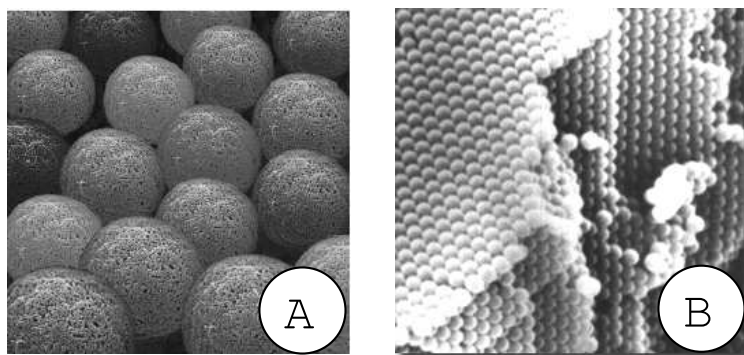


FIG. 1.25 – A : Latex poreux (extrait *Particles technologies in diagnostics*, Harri Härmä, TEKES); B : latex calibrés (Extrait de www.lehigh.edu/inchm/research/graduate/pse.html)

contenu dans le toluène est thermolysé conduisant au dépôt de cobalt à l'intérieur de la couche de polymère en train de se former.

Il a été aussi proposé de mettre des chlorures de cations métalliques en présence de particules de polystyrène portant des fonctions acrylamide, acrylonitrile et N-vinylimidazole. Ces fonctions permettent la fixation des ions métalliques sur la surface des particules par complexation puis par réduction avec NaBH_4 ou NH_2NH_2 .

1.3.4 Matrice synthétisée en présence des grains magnétiques

La plupart des particules magnétiques, notamment celles que nous utilisons, sont synthétisées selon cette voie. Elle consiste en une émulsification/polymérisation en présence de grains d'oxyde [Ibrahim et al., 1983].

La société RHÔNE-POULENC [Daniel et al., 1982] a été la première à développer ce procédé. Du ferrofluide mélangé avec du styrène et un initiateur (insoluble dans l'eau) est émulsionné dans une phase aqueuse. Après polymérisation les particules obtenues présentent une large distribution de taille : ceci est sûrement dû à un phénomène de mûrissement d'Oswald. La société ESTAPOR qui a repris ce savoir-faire propose également des particules pour lesquelles une couche supplémentaire de polymère a été ajoutée. Ceci permet d'obtenir d'autres groupes fonctionnels à la surface ou bien une surface plus hydrophile.

La société ADEMTECH est la seule à proposer, à l'heure actuelle, des petites particules magnétiques *calibrées* et fortement magnétiques (aimantation à saturation pour des particules de 200 nm de diamètre : 38 emu.g^{-1} , 300 nm : 42 emu.g^{-1}).

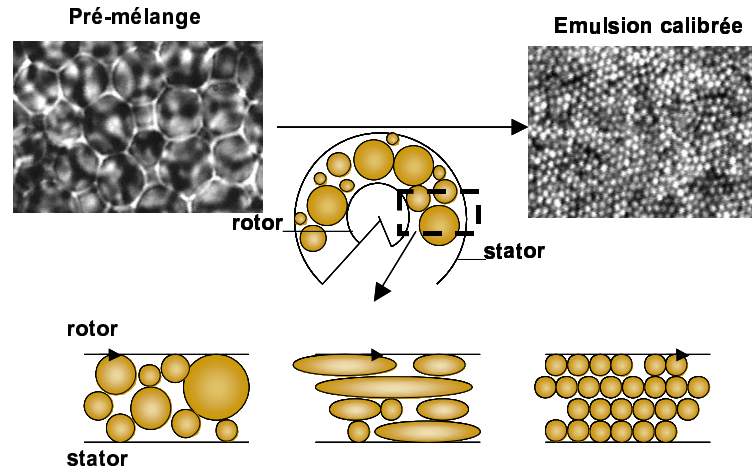


FIG. 1.26 – Principe de l’obtention d’émulsions calibrées : un pré-mélange est cisailé de façon contrôlée dans un entrefer étroit ($100\ \mu\text{m}$). La pression visqueuse déforme la goutte en un cylindre qui, à la suite d’une instabilité de Rayleigh [Mabille, 2000], se fragmente en gouttelettes de même taille.

Le processus passe par l’obtention d’une émulsion de ferrofluide calibrée. De nombreux travaux ont été réalisés sur la fragmentation contrôlée d’émulsions simples et multiples au Centre de Recherche Paul Pascal (Bordeaux). Ces travaux [Mason and Bibette, 1996] ont débouché sur la mise au point d’une technique (Fig.1.26) qui consiste à cisailier un pré-mélange viscoélastique en régime laminaire.

Le pré-mélange est un mélange grossier d’un ferrofluide organique dans une phase aqueuse contenant un tensio-actif non ionique. Le ferrofluide est obtenu par co-précipitation de sels de fer en phase aqueuse, puis stabilisation par complexation avec un tensio-actif ionique et enfin dispersion dans une phase organique.

La réalisation du pré-mélange pose certaines difficultés analogues à celles rencontrées lors de la réalisation d’émulsions doubles calibrées [Goubault et al., 2001]. Il convient en effet de résoudre les problèmes liés à la stabilité des interfaces solide/huile et huile/eau, afin d’élaborer un pré-mélange ayant un comportement rhéologique adéquat pour la fragmentation et qui conserve l’intégrité du ferrofluide en phase dispersée.

Vient ensuite une polymérisation interfaciale à base de dérivés styréniques (Fig.1.27). Cette encapsulation a pour but l’isolation des oxydes de fer et la fonctionnalisation de la particule. Le point crucial réside dans le contrôle de la morphologie tout en gardant la monodispersité.

A propos de la formulation : la première difficulté de cette méthode est d’obtenir une *émulsion stable et calibrée*. Il faut choisir judicieusement le tensio-

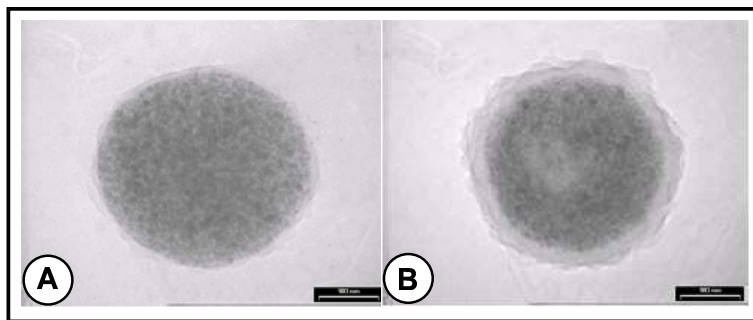


FIG. 1.27 – Evolution de la couche de polymères à la surface des particules au cours de la synthèse. Clichés de TEM par M. Gaboyard - ADEMTECH - Barre d'échelle : 100 nm

actif qui stabilisera les gouttes de ferrofluide sans perturber la stabilité des grains d'oxydes (stabilisés dans la phase organique grâce à un tensio-actif). De plus, des phénomènes de mûrissement peuvent se produire lorsque l'on ajoute dans le ferrofluide les monomères servant à la polymérisation ultérieure des gouttes. Ces monomères sont généralement un peu solubles dans l'eau (la solubilité du styrène est de 300 mg.L^{-1} à 20°C). Il y a alors transfert de matière entre les gouttes et ce, au travers de la phase continue (mûrissement d'Oswald). Cela se traduit par la diminution du diamètre moyen des petites gouttes jusqu'à leur disparition complète et l'augmentation du diamètre des plus grosses. Les conséquences d'un tel phénomène peuvent être : une large distribution de tailles, la formation de gouttes non magnétiques, une phase continue ternaire.

L'autre point important est la quantité de grains d'oxydes présents dans une particule. Un ferrofluide trop concentré en grains magnétiques est visqueux et difficilement émulsionnable.

La stratégie développée par la société ADEMTECH est d'utiliser un ferrofluide organique dont la phase continue est très légèrement soluble dans l'eau et de ne pas ajouter de monomères hydrophyles. Ce procédé permet de contrôler la taille (mûrissement faible) et de concentrer les particules en grains d'oxydes par un traitement thermique³⁰. La polymérisation des particules par ajout de composés après l'émulsification et le traitement thermique permet le *contrôle de la taille (et de la distribution de tailles), de la quantité de grains magnétiques ainsi que de l'état de surface des particules*.

1.3.5 Vers de nouveaux matériaux

Outre l'obtention de petites particules calibrées fortement magnétiques, le développement des particules porte actuellement sur le contrôle de leur surface : contrôle du pI, maîtrise de la stabilité, diminution des interactions non-spécifiques...

Les sociétés tendent également à développer des particules multifonctionnelles : des particules contenant des fluorophores ou des quantum dots,

³⁰Le traitement thermique permet également de minimiser le mûrissement.

portant plusieurs groupes fonctionnels différents...

Les voies de synthèse des particules magnétiques sont nombreuses. Peu, cependant, conduisent à l'obtention de particules valables (stables, qui restent magnétiques, relativement calibrées). Parmi les nombreuses sociétés qui élaborent les particules, on peut retenir les suivantes : DYNAL, MILTENYI, ADEMTECH, SERADYN et ESTAPOR.

Nous verrons que les travaux présentés dans ce manuscrit nécessitent des particules magnétiques relativement calibrées, de diamètre compris entre 0.2 et 0.9 μm (suivant les expériences), fortement magnétiques, portant des groupements COOH et surtout stables.

Trouver de telles particules fut une des tâches plus dures. Nous avons arrêté notre choix sur les particules de la société ADEMTECH.

Bibliographie

- [Alexiou et al., 2001] Alexiou, C., Arnold, W., Hulin, P., Klein, R., Renz, H., and Lübke, A. (2001). Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting. *J. Magn. Magn. Mater.*, 225 :187.
- [Allemand et al., 1996] Allemand, J.-F., Bensimon, D., and Croquette, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule . *Science*, 272(5263) :797.
- [Amblard et al., 1996] Amblard, F., Yurkes, B., Pargeliis, A., and Leibler, S. (1996). A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological systems. *Rev. Sci. Instrum.*, 67 :1.
- [Aytur et al., 2002] Aytur, T., Beatty, P., Boser, B., Anwar, M., and Ishikawa, T. (2002). An immunoassay platform based on CMOS Hall sensors. *Solid-state sensors, actuator and microsystems workshop*.
- [Bacri et al., 1997] Bacri, J., Da Silva, M., Perynski, R., Pons, J., and Halbreich, A. (1997). . *Scientific and chemical applications of magnetic carriers*, Plenum Press, page 597.
- [Bancaud, 2004] Bancaud, A. (2004). *Micromanipulation de fibres de chromatine individuelles par pinces magnétiques*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Baselt et al., 1998] Baselt, D., Lee, G., Natessan, M., Metzger, S. W., Sheehan, P., and Colton, R. (1998). A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 13 :731.
- [Baudry et al., 2004] Baudry, J., Bertrand, E., Lequeux, N., and Bibette, J. (2004). Colloidal assembling as bio-sensors. *J. Phys. : Condens. Matter*, soumis.
- [Bean, 1955] Bean, C. (1955). Hysteresis loops of mixtures of ferromagnetic micropowders. *J. Appl. Phys*, 26 (11) :1381.
- [Bibette et al., 2003] Bibette, J., Baudry, J., and Rousseau, A. (2003). Method for detecting analyte(s) using magnetic colloidal particles. page WO03044532.
- [Bílková et al., 1999] Bílková, Z., Masurová, J., Churáček, J., Horák, D., and Turková, J. (1999). Oriented immobilization of chymotrypsin by use of suitable antibodies coupled to a nonporous solid support. *J. Chromatogr. B*, 852 :141.

- [Bílková et al., 2002] Bílková, Z., Slováková, M., Horák, D. and Lenfeld, J., and Churáček, J. (2002). Enzymes immobilized on magnetic carriers - efficient and selective system for protein modification. *J. Chrom. B*, 770 :177.
- [Biswal and Gast, 2002] Biswal, S. and Gast, A. (2002). Magnetically actuated colloidal chains in microchannels. *MicroTAS 2002*, Y. Baba et al. Eds, Kluwer Acad. Pub, 2 :760.
- [Blin, 2003] Blin, N. (2003). Détection, purification et caractérisation des micrométastases médullaires dans le cancer du sein. Communication privée (Institut Curie, Paris).
- [Charmot, 1989] Charmot, D. (1989). . *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 76 :94.
- [Charvin et al., 2003] Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003). Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *PNAS*, 100 (17) :9820.
- [Chatterjee et al., 2002] Chatterjee, J., Y. Haik, Y., and Chen, C.-J. (2002). "Polyethylene magnetic nanoparticle : a new magnetic material for biomedical applications . *J. Magn. Magn. Mater.*, 246 :382.
- [Chen et al., 2003] Chen, S., Liu, L., Zhou, J., and Jiang, S. (2003). Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayers. *Langmuir*, 19 :2859.
- [Crick and Hughes, 1947] Crick, F. and Hughes, A. (1947). The physical properties of cytoplasm : a study by means of the magnetic particle method. *Exp. Cell Res.*, 1 :37.
- [Daniel et al., 1982] Daniel, J.-C., Schuppiser, J., and Tricot, M. (1982). Magnetic polymer latex and preparation process. *US Patent*, pages 4,358,388.
- [Dessinges, 2002] Dessinges, M. (2002). *Etude des propriétés élastiques d'une molécule d'ADN simple brin et interactions ADN-Hélicases à l'échelle de la molécule unique*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Dimitrova and Leal-Calderon, 1999] Dimitrova, T. and Leal-Calderon, F. (1999). Forces between emulsion droplets stabilized with Tween 20 and proteins. *Langmuir*, 15(26) :8813.
- [Doyle et al., 2002] Doyle, P., Bibette, J., Bancaud, A., and Viovy, J.-L. (2002). Self-Assembled Magnetic Matrices for DNA Separation Chips. *Science*, 295 :2237.
- [Duke and Austin, 1997] Duke, T. and Austin, R. (1997). Microchips for Sorting DNA. '*Physics of biological systems - Springer*', page 18.
- [Elaïssari, 2003] Elaïssari, A. (2003). *Colloidal polymers : synthesis and characterization*, volume 115.
- [Elaïssari and Bourrel, 2001] Elaïssari, A. and Bourrel, V. (2001). Thermosensitive magnetic latex particles for controlling protein adsorption and desorption. *J. Magn. Magn. Mater.*, 225 :151.

- [Elaïssari et al., 1998] Elaïssari, A., Chauvet, J., Halle, M., Decavallas, O., Pichot, C., and Cros, P. (1998). Effect of charge nature on the adsorption of single-stranded DNA fragments onto latex particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 202 :251.
- [Elmore, 1938] Elmore, W. (1938). Ferromagnetic colloid for studying magnetic structures. *Phys. Rev.*, 54 :309.
- [Esser, 1997] Esser, P. (1997). Principles in adsorption to polystyrene. *Nunc Bulletin*, 6(1).
- [Fan et al., 1999] Fan, Z., Mangru, S., Granzow, R., Heaney, P., Ho, W. and Dong, Q., and Kumar, R. (1999). Dynamic DNA hybridization on a chip using paramagnetic beads. *Anal. Chem.*, 71 :4851.
- [Fannin, 1998] Fannin, P. (1998). Wideband measurement and analysis techniques for the determination of the frequency-dependent, complex susceptibility of magnetic fluids. *Advances in Chemical Physics*, 104 :181.
- [Fermigier, 1999] Fermigier, M. (1999). *Hydrodynamique physique*.
- [Fulconis et al., 2004] Fulconis, R. Bancaud, A., Dutreix, M., and Viovy, J.-L. (2004). Twisting and untwisting a single DNA molecule covered by RecA protein. *soumis à Biophys. J.*
- [Furusawa et al., 1994] Furusawa, K., Nagashima, K., and Anzai, C. (1994). Synthesis process to control the total size and component distribution of multilayer magnetic composite-particles. *Colloid Polym. Sci.*, 272 :1104.
- [Ganachaud et al., 1997] Ganachaud, F., Elaïssari, A., and Pichot, C. (1997). Effect of Triton X-405 on the adsorption and desorption of single-stranded DNA fragments onto positively charged latex particles. *Langmuir*, 13 :7021.
- [Gosse and Croquette, 2002] Gosse, C. and Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.*, 82 :3314.
- [Goubault et al., 2001] Goubault, C., Pays, K., Olea, D., Gorria, P., Bibette, J., Schmitt, V., and Leal-Calderon, F. (2001). Shear rupturing of complex fluids : Application to the preparation of quasi-monodisperse water-in-oil-in-water double emulsions. *Langmuir*, 17(17) :5184.
- [Guo et al., 1994] Guo, Z., Guifoyle, R., Thiel, A., and R., W. (1994). Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.*, 22 :5456.
- [Guyon et al., 2003] Guyon, S., Bilkova, Z., Minc, N., Fuetterer, C., and Viovy, J.-L. (2003). Microfluidic proteolytic microreactors based on magnetic nanoparticles for proteomics. *Conférence Nanobiotechnologies II, Grenoble*.
- [Häfeli and Pauer, 1999] Häfeli, U. and Pauer, G. (1999). In vitro and in vivo toxicity of magnetic microspheres. *J. Magn. Magn. Mater.*, 194 :76.

- [Hager, 1974] Hager (1974). Latex polymer reagents for diagnostic tests. *US Patent*, pages 3,857,931.
- [Halbreich et al., 2002] Halbreich, A., Groman, E., Raison, D., Bouchaud, C., and Paturance, S. (2002). Damage to the protein synthesizing apparatus in mouse liver in vivo by magnetocytolysis in the presence of hepatospecific magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 248 :276.
- [Hancock and Kemshead, 1993] Hancock, J. and Kemshead, J. (1993). A rapid and highly selective approach to cell separation using immunomagnetic colloid. *J. Immunol. Meth.*, 164 :51.
- [Hermanson, 1996] Hermanson, G. (1996). *Bioconjugate techniques*.
- [Hinterdorfer et al., 1996] Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H., Schilcher, K., and Schindler, H. (1996). Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 93 :3477.
- [Holschuh, 2003] Holschuh, K. (2003). Silica magnetic particles for nucleic acid purification and adsorption of cells. Congrès : Second international meeting on the diagnostic applications of magnetic microspheres (Paris).
- [Huang et al., 1996] Huang, S.-C. P., Caldwell, K., Lin, J., Wang, H.-K., and Herron, J. (1996). Site-specific immobilization of monoclonal antibodies using spacer-mediated antibody attachment. *Langmuir*, 12 :4292.
- [Ibrahim et al., 1983] Ibrahim, A., Couvreur, P., Roland, M., and Speiser, P. (1983). New magnetic drug carrier. *J. Pharm. Pharmacol.*, 35 :59.
- [Israelachvili, 1985] Israelachvili, J. (1985). *Intermolecular and surface forces*.
- [Jeon and Andrade, 1991] Jeon, S. and Andrade, J. (1991). Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II : Effect of protein size. *J. Colloid Interface Sci.*, 142(1) :159.
- [Jeon et al., 1991] Jeon, S., Lee, J., Andrade, J., and De Gennes, P. (1991). Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I : Simplified Theory. *J. Colloid Interface Sci.*, 142(1) :149.
- [Jolivet and Tronc, 1988] Jolivet, J. and Tronc, E. (1988). Interfacial electron-transfer in colloidal spinel iron-oxide-conversion of Fe_3O_4 - $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ in aqueous-medium. *J. Colloid Interface Sci.*, 125 (2) :688.
- [Kandzia et al., 1984] Kandzia, J., Scholz, W., Anderson, M., and Müller-Ruchholtz, W. (1984). Magnetic albumin protein-A immunomicrospheres.1. Preparation, antibody-binding capacity and chemical-stability. *J. Immunol. Meth.*, 75 :31.
- [Khalafalla and G.W., 1980] Khalafalla, S. and G.W., R. (1980). Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE T. Magn.*, 16(2) :178.
- [Khalafalla and Reimers, 1973] Khalafalla, S. and Reimers, G. (1973). Procédé de préparation de liquide magnétique. *Patent*, page 73 272 90.

- [Kim et al., 2002] Kim, J.-H., Kwon, S.-K., and Kim, C. (2002). Adhesion of photosensitizer to ferrofluids for use in photodynamic therapy. *Nanotechnology*, 13 :610.
- [Klein, 1989] Klein, J. (1989). . *Phys. World*, 2 :35.
- [Kost et al., 1987] Kost, J., Wolfrum, R., and Langer, R. (1987). Magnetically controlled release systems : effect of polymer composition. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21 :1367.
- [Lacava, 1999] Lacava, Z. e. a. (1999). Toxic effect of ionic magnetic fluids in mice. *J. Magn. Magn. Mater.*, 194 :90.
- [Langer, 1990] Langer, R. (1990). New methods of drug delivery. *Science*, 249 :1527.
- [Leal-Calderon et al., 1994] Leal-Calderon, F., Stora, T., Mondain-Monval, O., Poulin, P., and Bibette, J. (1994). Direct measurement of colloidal forces. *Phys. Rev. Lett.*, 72 :2959.
- [Leckband and Israelachvili, 2001] Leckband, D. and Israelachvili, J. (2001). Intermolecular forces in biology. *Quarterly Review of Biophysics*, 34 :105.
- [Lee et al., 2000] Lee, G., Metzger, S., Natessan, M., Yanavich, C., and Dufrene, Y. (2000). Implementation of force differentiation in the immunoassay. *Anal. Biochem.*, 287 :261.
- [Lejon and Büscher, 2003] Lejon, V. and Büscher, P. (2003). Immuno-magnetic isolation of trypanosomes from blood. Congrès : Second international meeting on the diagnostic applications of magnetic microspheres (Paris).
- [Mabille, 2000] Mabille, C. (2000). *Fragmentation des émulsions dans un écoulement de cisaillement simple*. PhD thesis, Université Bordeaux 1.
- [Maier et al., 2000] Maier, B., Bensimon, D., and Croquette, V. (2000). Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *PNAS*, 97 (22) :12002.
- [Mason and Bibette, 1996] Mason, T. and Bibette, J. (1996). Emulsification in viscoelastic media. *Phys. Rev. Lett.*, 77(16) :3481.
- [Massart, 1980] Massart, R. (1980). Preparation of aqueous ferrofluids without using surfactant-behavior as a function of the pH and the counterions. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 291(1) serieC :1.
- [Massart and Cabuil, 1987] Massart, R. and Cabuil, V. (1987). Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline-medium-yield and particle-size control. *J. Chim. Phys. PCB*, 84(7-8) :967.
- [Melnychuk and Harrison, 2002] Melnychuk, O. and Harrison, D. (2002). Evaluation of the capture efficiency for DNA in a flow through device. *MicroTAS 2002, Y. Baba et al. Eds, Kluwer Acad. Pub*, 2 :903.

- [Mondain-Monval et al., 1998] Mondain-Monval, O., Espert, A., Omarjee, P., Bibette, J., Leal-Calderon, F., and Philipp, J. and Joanny, J.-F. (1998). Polymer induced repulsive forces : an exponential scaling. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :1778.
- [Montagne et al., 2002] Montagne, F., Mondain-Monval, O., Pichot, C., Mozzanega, H., and Elaïssari, A. (2002). Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion . *JMMM*, 250 :302.
- [Müller-Schulte et al., 1997] Müller-Schulte, D., Füss, F., De Cuyper, M., Häfeli, U., Teller, J., and Zborowski, M. (1997). *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, volume p93. Plenum New York.
- [Nakamae et al., 1993] Nakamae, K., Tanigawa, S., Tsujiguchi, T., Okamoto, S., and Yamaguchi, K. (1993). Solvent effect on adsorption of polymers on gamma-Fe₂O₃ particles. *Colloid Surf. A*, 80(1) :85.
- [Néel, 1949] Néel, L. (1949). Influence des fluctuations thermiques sur l'aimantation de grains ferromagnétiques très fins. *CR Heb. Acad. Sci.*, 228 (8) :664.
- [Omarjee, 1999] Omarjee, P. (1999). Mesure directe des forces de surfaces entre colloïdes stabilisés par des polymères. *Thèse - Université Bordeaux 1*.
- [Pankhurst et al., 2003] Pankhurst, Q., Connolly, J., Jones, S., and Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 36 :R167.
- [Papell, 1965] Papell, S. (1965). Low viscosity magnetic fluid obtained by the colloidal suspension of magnetic particles . *US Patent*, page 3 215 572.
- [Peluso et al., 2003] Peluso, P., Wilson, D., Do, D., Tran, H., and Nock, S. (2003). Optimizing antibody immobilization strategie for the construction of protein microassays. *Anal. Biochem.*, 312(2) :113.
- [Perret et al., 2002] Perret, E., Leung, A., Morel, A., Feracci, H., and Nassoy, P. (2002). Versatile decoration of glass surfaces to probe individual protein-protein interactions and cellular adhesion. *Langmuir*, 18 :846.
- [Philip et al., 1999] Philip, J., Mondain-Monval, O., Leal-Calderon, F., and Bibette, J. (1999). Forces between colloidal droplets in the presence of a weak polyelectrolyte. *B. Mater. Sci.*, 22(3) :313.
- [Prené, 1995] Prené, P. (1995). Particules d'oxyde de fer spinelle- physico-chimie des dispersions et comportement magnétique. *Thèse. Université P. et M. Curie*.
- [Prieve, 1999] Prieve, D. (1999). Measurement of colloidal forces with TIRM. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 82 :93.
- [Prime and Whitesides, 1991] Prime, K. and Whitesides, G. (1991). Self-assembled organic monolayers - Model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*, 252(5009) :1164.

- [Prime and Whitesides, 1993] Prime, K. and Whitesides, G. (1993). Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide) : a model system using self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 115 :10714.
- [Qian et al., 1999] Qian, W., Yao, D., Xu, B., Yu, F., Lu, Z., and Knoll, W. (1999). Atomic Force Microscopic studies of site-directed immobilization of antibodies using their carbohydrates residues. *Chem. Mater.*, 11 :1399.
- [Ramsey, 1999] Ramsey, J. (1999). The burgeoning power of the shrinking laboratory. *Nature Biotechnology*, 17 :1061.
- [Rembaum et al., 1980] Rembaum, A., Amitava, G., and Willi, V. (1980). Polyvinyl pyridine microspheres . page US4224359.
- [Roseinsweig, 1975] Roseinsweig, R. (1975). Ferrofluid Compositions and Process of Making Same . *US Patent*, page 3 917 538.
- [Safarik et al., 1995] Safarik, I., Safarikova, M., and Forsythe, S. (1995). The application of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, 78 :575.
- [Senyei et al., 1978] Senyei, A., Widder, K., and Czerlinski, G. (1978). Magnetic guidance of a drug-carrying microspheres. *J. Appl. Phys.*, 49(6) :3578.
- [Sershen and West, 2002] Sershen, S. and West, J. (2002). Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54 :1225.
- [Shchepinov et al., 1997] Shchepinov, M., Case-Green, S., and Southern, E. (1997). Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.*, 25(6) :1155.
- [Shimoiizaka et al., 1976] Shimoiizaka, J., Nakatsuka, K., Chubachi, R., and Sato, Y. (1976). Stabilization of aqueous magnetite suspension : preparation of water-base magnetic fluid . *Nippon Kagaku Kaishi*, 1 :6.
- [Shimomura et al., 1996] Shimomura, M., Kikuchi, H., Yamaguchi, K., and Miyauchi, S. (1996). Covalent immobilization of glucose oxidase on magnetite particles via graft polymerization of acrylic acid. *J. Macromol. Sci. Pure*, A33(11) :1687.
- [Shinkai et al., 1991] Shinkai, M., Honda, H., and T., K. (1991). Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization. *Biocatalysis*, 5 (1) :61.
- [Spitznagel and Clark, 1993] Spitznagel, T. and Clark, D. (1993). Surface-density and orientation effect on immobilized antibodies and antibodies fragments. *Bio-Technology*, 11(7) :825.
- [Strick et al., 2000] Strick, T., Croquette, V., and Bensimon, D. (2000). Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404(6780) :901.

- [Suzuki et al., 1995] Suzuki, M., Shinkai, M., Kamihira, M., and Kobayashi, T. (1995). Preparation and characteristics of magnetite-labeled antibody with the use of poly(ethylene glycol) derivatives. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 21 :335.
- [Ugelstad et al., 1974] Ugelstad, J., Hansen, F., and Lange, S. (1974). Emulsion polymerization of styrene with sodium hexadecylsulfate/hexadecanol mixtures as emulsifiers – Initiation in monomer droplets. *Makromol. Chem.*, 175 (2) :507.
- [Ugelstad and Mork, 1980] Ugelstad, J. and Mork, P. (1980). Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsion and polymer dispersions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 13 :101.
- [Ugelstad et al., 1993] Ugelstad, J., Stenstad, P., Kilaas, L., Prestvik, W., Herje, R., Berge, A., and Hornes, E. (1993). Monodisperse Magnetic Polymer Particles. *Blood Purif.*, 11 :349.
- [Veyret, 2003] Veyret, R. (2003). *Elaboration de particules magnétiques pour la capture spécifique et non spécifique de virus et pour la capture générique de virus*. PhD thesis, Université Claude Bernard, Lyon 1.
- [Veyret et al., 2003] Veyret, R., Delair, T., Pichot, C., and A., E. (2003). Magnetic colloids for bio-molecules extraction and concentration. Congrès : Second international meeting on the diagnostic applications of magnetic microspheres (Paris).
- [Vikholm and Albers, 1998] Vikholm, I. and Albers, W. (1998). Oriented immobilization of antibodies for immunosensing. *Langmuir*, 14 :3865.
- [Weimer et al., 2000] Weimer, B., Walsh, M., and Wang, X. (2000). Influence of poly-ethylene glycol spacer on antigen capture by immobilized antibodies. *J. Biochem. Methods*, 45 :211.
- [Weissleder et al., 1967] Weissleder, R., Stark, D., Engelstad, B., and Lewis, L. (1967). Superparamagnetic iron-oxide-pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol*, 152(1) :167.
- [Wheatley, 1991] Wheatley, J. (1991). Effect of antigen size on optimal ligand density of immobilized antibodies for high-performance liquid chromatographic support. *J. Chromatogr.*, 548(1-2) :243.
- [Widder et al., 1979] Widder, K., Flouret, G., and Senyei, A. (1979). Magnetic microspheres-Synthesis of a novel parenteral drug carrier. *J. Pharm. Sci.*, 68(1) :79.
- [Wilhelm, 2002] Wilhelm, C. (2002). *Développement d'une sonde intracellulaire : l'endosome magnétique*. PhD thesis, Université Paris 7 Denis Diderot.
- [Winnik et al., 1995] Winnik, F., Morneau, A., Ziolo, R., Stöver, H., and Li, W.-H. (1995). Template-controlled synthesis of superparamagnetic goethite within macroporous polymeric microspheres. *Langmuir*, 11 :3660.
- [Wu et al., 2003] Wu, H., Odom, T., Chiu, D., and Whitesides, G. (2003). Fabrication of complex three-dimensional microchannel systems in PDMS. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(2) :554.

- [Zins et al., 1999] Zins, D., Cabuil, V., and Massart, R. (1999). New Aqueous Magnetic Fluids. *J. Molecular Liquids*, 83 :217.

En guise de préambule...

... au Chapitre 2

Dans ce Chapitre, la réalisation de matériaux nouveaux, les filaments magnétiques, est présentée. Ces filaments sont constitués de particules magnétiques assemblées entre elles, à l'image de colliers de perles, par des polymères ou des liens biologiques (protéines, sandwich anticorps-antigène-anticorps).

Le champ magnétique permet de contrôler l'assemblage des particules entre elles. Les filaments ainsi obtenus sont parfaitement linéaires. Il est aussi possible de contrôler le nombre de liens entre particules.

La conception de tels objets requiert la maîtrise (i) de la stabilité colloïdale lors des différentes étapes (greffage de protéines, mise en présence de milieux salins et/ou biologiques,...) et (ii) de leurs fonctionnalisation et caractérisation.

Chapitre 2

Auto-assemblages irréversibles linéaires

Sous l'effet des interactions dipolaires, les particules magnétiques s'*auto-assemblent* en différentes structures telles que des chaînes, des réseaux de chaînes ou des labyrinthes (Fig.2.1). Ces structures dépendent de la direction et de l'intensité du champ appliqué ainsi que de la quantité de particules. Elles sont a priori *réversibles* : l'agitation thermique suffit à les disperser quand le champ est annulé.

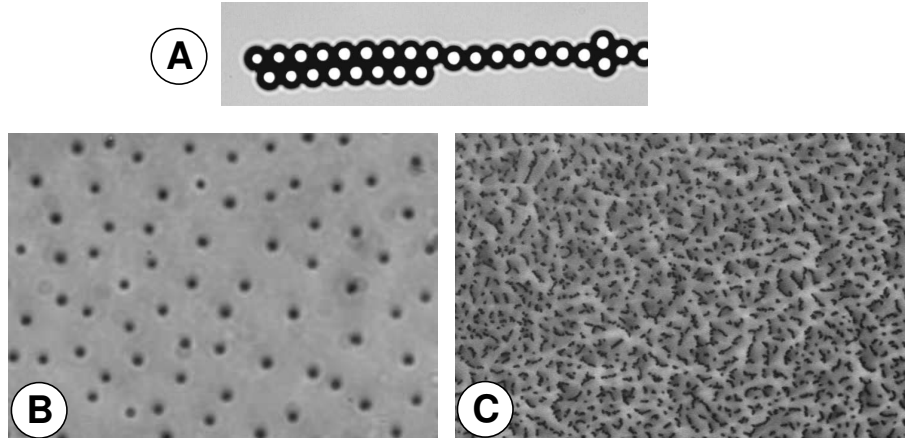


FIG. 2.1 – A : Chaînes de particules magnétiques. B : Réseau de colonnes vu de dessus. C : Structure “labyrinthe”. Clichés C.G.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux types de structures : la *chaîne unique*, qui est le premier degré d'organisation du système, et le *réseau de colonnes*, qui consiste en des chaînes régulièrement espacées. Ce chapitre ainsi que le suivant seront consacrés à l'obtention et à l'étude de chaînes magnétiques rendues “*permanentes*”.

Obtenir des assemblages colloïdaux irréversibles de particules demande que celles-ci se rencontrent afin qu’un processus de collage, médié par des interactions non spécifiques (van der Waals, ...) ou par des molécules-liens, se déclenche. La plupart des études effectuées jusqu’alors ont utilisé l’agitation thermique pour ce faire (collage dit “ $k_B T$ -induits”). Les structures ainsi obtenues sont des “gels colloïdaux” ou des objets de formes plus contrôlées en utilisant des collages spécifiques.

L’apport supplémentaire de l’étude présentée ici est de contrôler la forme des assemblages et le processus de collage par application d’un champ magnétique sur des particules superparamagnétiques. Le collage se produit une fois que les particules sont organisées sous forme de chaînes. Les assemblages ainsi obtenus sont parfaitement linéaires et irréversibles.

Dans un premier temps, une revue des assemblages “ $k_B T$ -induits” sera effectuée. Puis nous présenterons le processus physique conduisant à l’organisation des particules magnétiques sous forme de chaînes. Deux types de collage de particules magnétiques seront alors présentés : un collage “*magnéto-stimulé*” (induit grâce au rapprochement, par le champ magnétique, des particules magnétiques portant les molécules-colle) et un collage “*post-organisation*” (la colle est introduite une fois les particules organisées).

2.1 Assemblages colloïdaux – Etat de l’art

2.1.1 Assemblages colloïdaux $k_B T$ -induits

Un moyen d’assembler des colloïdes de façon contrôlée est d’utiliser des adhésions spécifiques, de type biologique (hybridation d’oligonucléotides [Mirkin, 2000] ou reconnaissance antigène/anticorps [Mann et al., 2000]). C’est alors l’agitation thermique qui fait se rencontrer les particules. Ce principe est utilisé depuis plus de 40 ans dans les tests d’agglutination servant à détecter et quantifier des protéines [Singer and Plotz, 1956].

Un premier exemple peut être trouvé dans [Nam et al., 2002] qui combine les deux types de reconnaissance précédemment cités (hybridation et reconnaissance spécifique). Cette combinaison permet de détecter des protéines : des haptènes¹, greffés sur des oligonucléotides, sont fixés sur des particules d’or portant des oligonucléotides complémentaires. En présence de l’anticorps correspondant, la solution change de couleur, signe que les particules d’or s’agrègent

¹On qualifie par ce terme toute espèce moléculaire (essentiellement des substances organiques de faible masse moléculaire) qui, au contact du système immunitaire d’un individu, est incapable de susciter une réponse immunitaire mais qui, associée ou chimiquement couplée à une macromolécule biologique ou synthétique qui lui sert de porteur, pourra induire une telle réponse.

(Fig.2.2). Afin d'identifier les protéines capturées, on détermine la température de fusion (ou température de déshybridation) caractéristique de l'hybridation des oligonucléotides. On peut citer, comme deuxième exemple, les travaux de

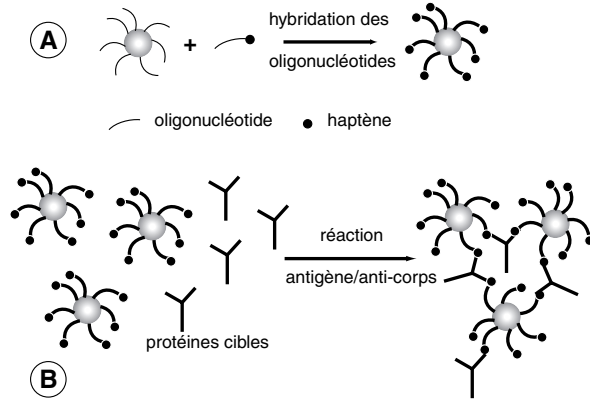


FIG. 2.2 – A : obtention de particules portant des haptènes via l'hybridation d'oligonucléotides. B : Formation d'agrégats en présence de la protéine cible.

[Hiddessen et al., 2000]. Ces derniers assemblent deux types de colloïdes (des particules de $0.94 \mu\text{m}$ greffées avec des E-selectines et des particules de $5.5 \mu\text{m}$ greffées avec des sialyl Lewis^x carbohydrates) en utilisant des systèmes biologiques ayant une faible affinité (carbohydrates/sélectines). Différentes structures sont obtenues en faisant varier le rapport des deux types de colloïdes, la quantité de colloïdes, ainsi que le temps de réaction (Fig.2.3).

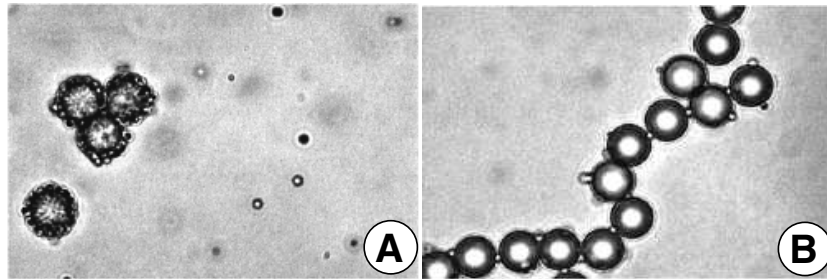


FIG. 2.3 – Effets du rapport du nombre relatif de particules N_a/N_b . A : particules de $0.94 \mu\text{m}$ greffées avec des E-selectines; B : particules de $5.5 \mu\text{m}$ greffées avec des sialyl Lewis^x carbohydrates. A : $N_a/N_b=100$; B : $N_a/N_b=2$. Temps d'incubation : une semaine. Images extraites de [Hiddessen et al., 2000].

2.1.2 Chaînes magnétiques

L'application d'un champ magnétique induit un moment magnétique dans chaque particule. L'interaction dipolaire conduit à l'agrégation des particules sous forme de chaînes, orientées selon la direction du champ. Suivant la concentration

en particules et le rapport entre l'énergie magnétique et l'énergie thermique, on observe des structures variées [Furst and Gast, 2000] telles que des chaînes isolées, des chaînes comportant des défauts, des chaînes épaisses de plusieurs particules, ou encore des chaînes rigides ou bien fluctuantes (Fig.2.4).

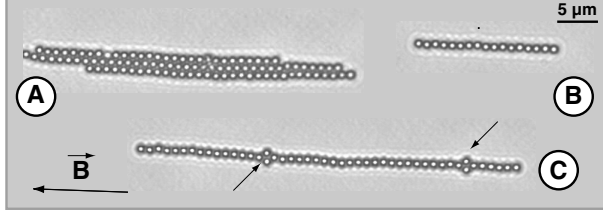


FIG. 2.4 – Particules magnétiques (1μm, Dynal) soumises à un champ magnétique. A : chaînes épaisses, B : chaîne isolée fluctuante, C : présence de défauts. Clichés C.G.

Nous nous intéressons au cas des chaînes isolées.

Considérons deux particules (1) et (2) que nous assimilons à des dipôles ponctuels $\vec{m}_1$ et $\vec{m}_2$. En adoptant la convention USI², l'énergie d'interaction s'écrit alors :

$$U_{1,2} = \frac{\mu_0 [r^2(\vec{m}_1 \cdot \vec{m}_2) - (\vec{m}_1 \cdot \vec{r})(\vec{m}_2 \cdot \vec{r})]}{4\pi r^5}$$

$\vec{r}$ est le vecteur position de (2) par rapport à (1), se reporter à la Fig.2.5 et μ_0 la permittivité du vide.

Les particules étant identiques, les moments m_1 et m_2 sont égaux et s'expriment comme :

$$m_1 = m_2 = m = \frac{4\pi}{3} a^3 \chi H$$

où χ est la susceptibilité magnétique effective d'une particule (en tenant compte de la forme sphérique). L'expression de $U_{1,2}$ se simplifie alors :

$$U_{1,2} = \frac{\mu_0 m^2}{4\pi r^3} (1 - 3 \cos^2 \alpha)$$

où α est l'angle formé par la direction du champ et l'axe reliant les deux particules.

Ainsi, si $\cos \alpha \leq 1/\sqrt{3}$, l'interaction entre les particules est attractive. On peut donc considérer un double cône d'angle 55° autour de chaque particule, à l'intérieur duquel les interactions seront attractives (Fig.2.5). L'énergie d'interaction est minimale pour $\alpha=0$. Ainsi, les particules s'alignent et tendent à former des chaînes, mais l'agitation thermique s'oppose à cette tendance. Le paramètre adimensionnel λ caractérise cette compétition :

$$\lambda = \frac{U_{1,2}(\alpha = 0, r = 2a)}{k_B T} = \frac{\mu_0 \pi \chi^2 H^2 a^3}{9 k_B T}$$

Si $\lambda \gg 1$, le champ magnétique est suffisamment fort pour dominer les fluctuations thermiques. Les particules s'organisent alors sous forme de chaînes et restent

²Unité Système International.

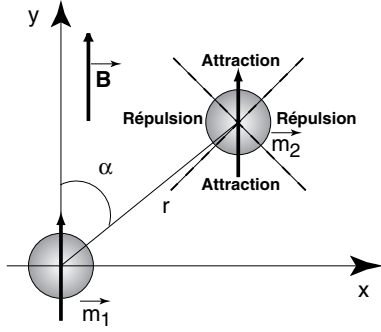


FIG. 2.5 – Interaction magnétique entre deux particules, situées à une distance r , en présence d'un champ magnétique.

agrégées tant que le champ est appliqué (Fig.2.6).

Pour des champs faibles ($\lambda \simeq 1$), l'agrégation est un processus dynamique : sous champ, les particules s'agrègent et se désagrègent sans cesse.

Dans notre cas, $H=1.10^4 \text{ A.m}^{-1}$, $\chi=1$, $2a=0.75 \mu\text{m}$ d'où $\lambda= 550$.

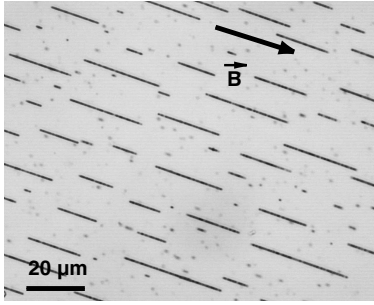


FIG. 2.6 – Particules magnétiques soumises à un champ magnétique ; organisation sous forme de chaînes parallèles à la direction du champ. Cliché C.G.

Si l'on néglige toute autre interaction (van der Waals, électrostatiques) :

A faible fraction volumique ϕ ($\phi < 1\%$, $\lambda \gg 1$) : les chaînes croissent par leurs extrémités, par addition de particules isolées ou de chaînes de particules (Fig.47). [Fermigier and Gast, 1992] ont montré que l'agrégation était limitée par le transport. Quand les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres, elles diffusent de manière brownienne. Quand elle sont suffisamment proches, de telle sorte que l'interaction dipolaire devient de l'ordre de $k_B T$, le mouvement devient balistique et les particules s'agrègent rapidement. Des cinétiques d'agrégation faites en volume [Promislow et al., 1995] démontrent que la taille moyenne des chaînes $\langle s(t) \rangle$ suit une loi de puissance de la forme $\langle s(t) \rangle \sim t^z$ où z est supérieur à 0.5 et varie comme l'inverse de λ et de ϕ (en dessous d'une certaine valeur critique de ϕ). *A forte fraction volumique (de l'ordre de 3%)* : dans un premier temps, les particules forment des chaînes qui s'agrègent ensuite latéralement pour donner des chaînes épaisses ou colonnes. [Halsey and Toor, 1990] ont été les premiers à proposer un modèle (appelé *HT*) pour des fluides électro-rhéologiques. Ce modèle considère que les fluctuations le long des chaînes entraînent une variation de la densité du moment dipolaire produisant alors une interaction attractive

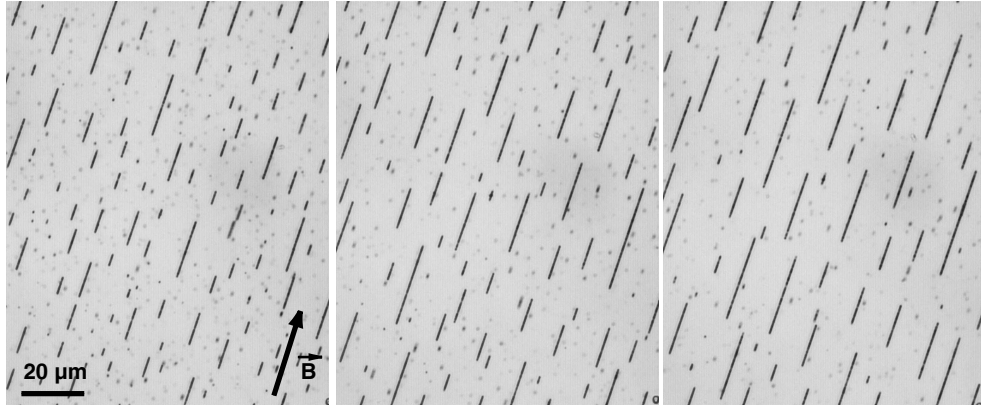


FIG. 2.7 – Chaînes magnétiques qui croissent par leurs extrémités. Particules magnétiques de $0.75 \mu\text{m}$ de diamètre, $\phi \simeq 0.1\%$ en volume (Ademtech).

latérale (de type Keesom). [Furst and Gast, 2000] ont repris et modifié ce modèle. Ils constatent que la présence de défauts induit également des interactions attractives. Ce mécanisme d'agrégation latérale dépend de nombreux facteurs tels que ϕ , λ et tout ce qui peut induire des défauts au sein des chaînes comme la polydispersité des particules, la cinétique d'agrégation. Ceci est résumé dans la Fig.2.8. Pour une revue sur ce sujet, le lecteur pourra se référer à [Melle, 2002].

La croissance de chaînes magnétiques sous champ continu d'intéresser les chercheurs qui étudient à présent les cinétiques d'agrégation lorsqu'une force extérieure est appliquée, par exemple un flux hydrodynamique [Pérez-Castillo et al., 2000].

La force entre particules magnétiques en fonction de la distance d entre particules (centre à centre) a été calculée exactement [Zhang and Widom, 1995] et est donnée par :

$$F_m(d) = -\frac{1.202 \mu_0}{2\pi} \times \frac{3m^2}{d^4}$$

où m est le moment magnétique d'une particule, soit

$$F_m(h) = -\frac{9.616 \pi}{3 \mu_0} \times \frac{a^6 \chi^2 B^2}{(2a + h)^4}$$

où h est la distance bord à bord entre particules, a le rayon d'une particule, χ la susceptibilité magnétique effective d'une particule et B l'intensité du champ magnétique appliqué.

La Fig.2.9 montre les valeurs de la force magnétique entre les particules (V2G, ADEMTECH) que nous utilisons en fonction de leur distance.

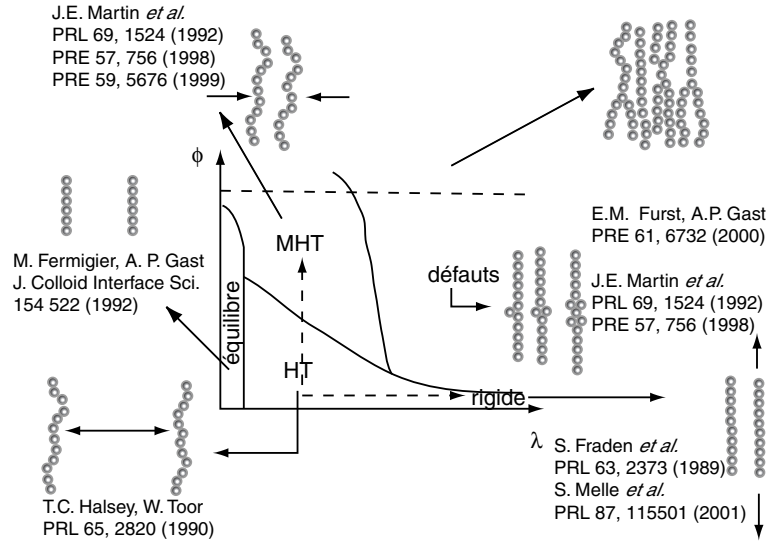


FIG. 2.8 – Diagramme fraction de particules (ϕ), λ illustrant l’aggrégation des particules aux temps courts. HT : modèle de Hasley et Toor ; MHT : modèle de Hasley et Toor modifié. Extrait de [Melle, 2002].

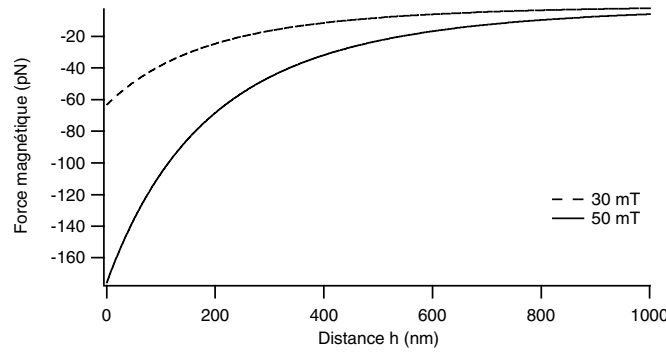


FIG. 2.9 – Variation de la force magnétique entre particules en fonction de leur distance bord à bord ($a=0.375 \mu\text{m}$, $\chi=1$).

2.1.3 Chaînes magnétiques irréversibles

Deux groupes ont travaillé sur l’obtention de chaînes magnétiques irréversibles : le groupe d’A. Gast et celui de J. Bibette. Leur approche est très différente.

Le groupe d’A. Gast utilise un collage “*post-organisation*” : une fois les chaînes magnétiques formées, un composé est introduit, qui va ponter les particules entre elles.

Dans [Furst et al., 1998] des particules magnétiques ($0.94 \mu\text{m}$ de diamètre,

Bangs Laboratories), portant des fonctions NH_2 et COOH , sont placées dans une cellule dont la paroi supérieure est constituée d'une membrane semi-perméable. Le champ magnétique est appliqué perpendiculairement à la cellule et du glutaraldéhyde (agent pontant) est introduit par la membrane (Fig.2.10). Au bout de 1h30, la réaction est arrêtée et les chaînes sont stabilisées par ajout de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, tensio-actif anionique).

A. Gast *et al.* obtiennent également des chaînes permanentes non plus de façon covalente mais en jouant sur les interactions non spécifiques entre particules. Ainsi après organisation des particules magnétiques (non fonctionnalisées, $0.5\ \mu\text{m}$ de diamètre) stabilisées par du SDS, dans le même type de cellule, du sel ($\text{NaCl}\ 0.1\text{M}$) est introduit. L'écrantage des interactions électrostatiques fait que les interactions de van der Waals agrègent alors de façon irréversible les particules, conduisant à la formation de chaînes (Fig.2.10.C.).

Plus récemment et sur le même principe, [Biswal and Gast, 2003] ont utilisé les adhésions spécifiques de type biologique pour assembler des particules fonctionnalisées avec de la streptavidine ($0.78\ \mu\text{m}$, SERADYN INC.) via des liens PEG-biotine ($M_W=3400\ \text{g.mol}^{-1}$ ou $M_W=733\ \text{g.mol}^{-1}$).

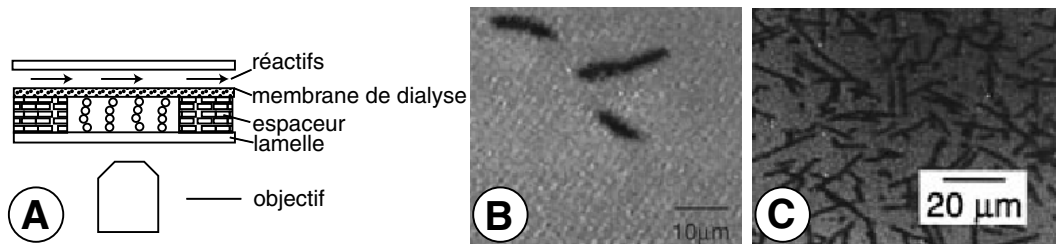


FIG. 2.10 – A : des chaînes calibrées sont formées entre une lamelle et une membrane de dialyse par application d'un champ magnétique perpendiculairement à la lamelle. Les réactifs sont amenés à travers la membrane. B : Chaînes magnétiques permanentes obtenues par greffage covalent : des particules ($0.94\ \mu\text{m}$ de diamètre) portant des fonctions COOH et NH_2 sont pontées par du glutaraldéhyde. C : Chaînes permanentes obtenues par interactions de van der Waals. Les particules ont un diamètre moyen de $0.5\ \mu\text{m}$. Extrait de [Furst et al., 1998]

Le principe d'obtention de chaînes permanentes par *le groupe de J. Bibette* repose sur un collage "*magnéto-stimulé*" : la colle est préalablement mélangée avec les particules et c'est l'application d'un champ adéquat qui rend les chaînes permanentes.

En étudiant les forces entre colloïdes induites par des polyélectrolytes (voir paragraphe 1.1.3), [Philip et al., 1997] ont obtenu des chaînes permanentes quand les particules colloïdales sont approchés suffisamment près les unes des autres.

Pour de faibles concentrations en PAA³, les émulsions magnétiques (de $0.2\ \mu\text{m}$ de diamètre) sont soumises à des interactions répulsives d'origine électrostatique et stérique. Le profil de force entre colloïdes dans une solution contenant 0.1% en masse de PAA et 0.1% en masse de NP10⁴ présente un saut quand les colloïdes sont distants d'environ 25 nm (Fig.2.11). J. Philip *et al.* observent qu'après le saut (distance entre colloïdes inférieure à 25 nm) de petites chaînes irréversibles se sont formées et que, plus la distance entre particules diminue, plus la taille de chaînes augmente (Fig.2.12). [Dimitrova, 2000] observent également ces phénomènes d'adhésion sur des émulsions stabilisées par de la β -lactoglobuline ou de la β -caséine.

C'est cette deuxième voie *i.e.* le collage “magnéto-stimulé” que nous avons reprise et adaptée à nos particules.

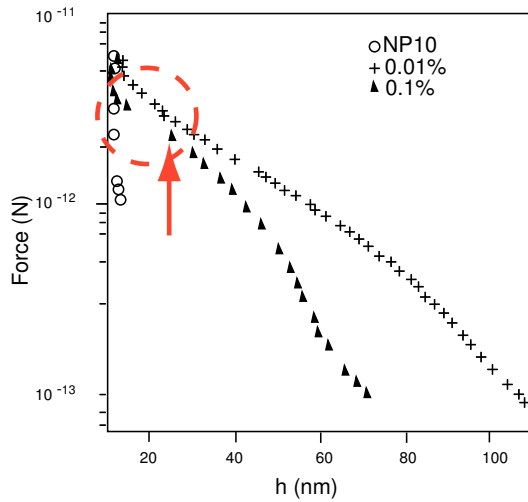


FIG. 2.11 – Profil force/distance pour une solution de PAA à deux concentrations (à pH 4) : $\times$ 0.01% en masse, $\blacktriangle$ 0.1% en masse, $\circ$ NP10. La courbe correspondant à PAA 0.1% en masse présente un saut correspondant à la formation de liens irréversibles. Extrait de [Philip et al., 1997].

Nous allons maintenant présenter nos travaux sur la réalisation de filaments magnétiques. Ces filaments sont constitués de particules magnétiques assemblées entre elles par des polymères ou des liens biologiques (protéines, sandwich anticorps-antigène-anticorps).

2.2 Collage magnéto-stimulé : polymère adsorbé

Dans ce chapitre, nous présentons le collage *magnéto-stimulé* entre particules magnétiques recouvertes de *polymères adsorbés*. Ce mode de collage est contrôlé

³Poly(acide acrylique), $M_W = 250\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$, rayon de giration 35 nm en bon solvant. Concentration de 0.01% en masse.

⁴tensio-actif non ionique.

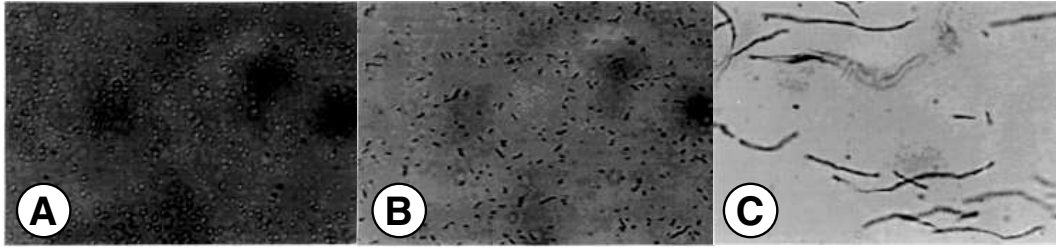


FIG. 2.12 – A : Emulsion magnétique (diamètre moyen $0.2 \mu\text{m}$) en présence d'une solution de PAA à 0.1% en masse, avant application d'un champ magnétique. B : Petites chaînes irréversibles. C : Longues chaînes irréversibles obtenues avec un champ magnétique plus fort qu'en B. Extrait de [Philip et al., 1997].

par le champ magnétique. Nous illustrons ce cas avec l'exemple du poly(acide acrylique) ou PAA.

2.2.1 Principe

Nous utilisons des particules magnétiques (Emulsion V2G, ADEMTECH⁵, dispersées dans une phase aqueuse, sur lesquelles du PAA ($M_W=250\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) est adsorbé.

Dans la gamme de pH à laquelle nous travaillons ($2 < \text{pH} < 4$), le PAA est pratiquement neutre ($\text{pK}_A=6$, voir Annexe 1). Moins soluble dans l'eau, il s'adsorbe alors à l'interface des particules magnétiques. Le début de ce phénomène est rapide mais l'équilibre n'est atteint qu'au bout d'une dizaine d'heures [Cohen-Tannoudji, 2003].

Des études de zétamétrie réalisées à $\text{pH}=3.8$ et 6 mesurent un potentiel zéta des particules de -17.5 mV et -31.5 mV respectivement [Cohen-Tannoudji, 2003]. Dans nos conditions de travail ($2 < \text{pH} < 4$), les particules sont donc faiblement chargées. Les charges proviennent des grains d'oxydes de fer et de l'acide oléique ($\text{pK}_A \simeq 5$) présents à la surface des particules.

Entre particules recouvertes de polymères, différents phénomènes peuvent se produire selon la nature de la phase continue et la concentration en polymère :

- *si les chaînes polymériques sont en bon solvant dans la phase continue et si le taux d'adsorption est important*, les forces entre particules sont répulsives. Ceci est dû à la perte d'entropie des chaînes induite par le confinement entre deux particules. La force répulsive est de la forme $F(d) = F_0 \exp(-d/R_g)$, d étant la distance entre les particules et R_g le rayon de giration du polymère ;
- *si la surface des particules est peu recouverte*, une même chaîne de polymère

⁵Les particules ont subi un traitement thermique afin d'éliminer l'octane présent à l'intérieur. Leur diamètre est de $0.75 \mu\text{m}$.

peut s'adsorber sur deux particules à la fois et conduire à leur agrégation irréversible. On parle alors de phénomène de pontage ;

- *si les chaînes polymériques sont en mauvais solvant dans la phase continue*, les interactions chaînes-chaînes étant plus favorables que les interactions chaînes-solvant, il apparaît une force attractive entre les couches adsorbées.

Nous allons montrer comment formuler un système (polymère plus particules) stable en l'absence de champ et adhésif sous champ magnétique. Lorsque l'on rapproche les particules magnétiques, à l'aide d'un champ magnétique, le polymère adsorbé sur une particule pourra venir s'adsorber sur la particule adjacente. On obtient alors des chaînes irréversibles. On verra que le temps nécessaire pour le collage dépend de la distance entre particules (donc de l'intensité du champ magnétique), du taux d'adsorption du polymère ainsi que de sa taille.

Pour ce faire nous avons choisi de fabriquer des chaînes irréversibles selon la méthode imaginée à partir de [Philip et al., 1999]. La technique consiste à adsorber un polyélectrolyte (le PAA, $M_W = 250\,000\text{ g.mol}^{-1}$) à la surface de particules neutres. Pour un champ magnétique faible, les chaînes obtenues sont réversibles mais au-dessus d'un champ seuil, les auteurs observent des chaînes irréversibles. La quantité de PAA utilisée est de 0.1% en masse et la taille des particules est de $0.2\mu\text{m}$ de diamètre, à une fraction volumique non précisée.

Nous disposons de particules plus grosses ($0.75\mu\text{m}$ de diamètre) de nature différente. Nous devons donc déterminer la gamme de concentrations en PAA qui permet l'obtention de chaînes irréversibles avec ce type de particules.

2.2.2 Conditions d'obtention de particules magnétiques stables recouvertes de PAA

L'ajout d'une substance, quelle qu'elle soit, dans la phase continue d'une émulsion peut perturber sa stabilité.

Il convient donc d'étudier l'influence du PAA sur la stabilité de l'émulsion avant que le champ ne soit appliqué. En effet, on souhaite que ce soit *uniquement* le champ magnétique qui contrôle l'agrégation des particules.

En l'absence de compression (par le champ magnétique), le PAA peut déstabiliser l'émulsion : (i) *par pontage*, à faible concentration en polymère⁶, une même chaîne polymérique peut s'adsorber sur deux interfaces ; (ii) *par déplétion*, ce type d'interactions intervient dans les suspensions colloïdales contenant deux types d'objets de tailles bien distinctes comme des pelotes de polymères et des particules magnétiques. Quand la distance qui sépare les gros objets devient petite, il apparaît un volume exclu pour les petits objets et donc une zone de pression

⁶A plus forte concentration, les particules sont saturées et on retrouve une interaction répulsive d'origine entropique. Le PAA étant un polyélectrolyte, les répulsions peuvent être également d'origine électrostatique.

non compensée entraînant la floculation des gros objets.

On observe, dans les deux cas, la formation d'agrégats. Il s'agit pour nous de déterminer dans quelle zone du diagramme *concentration en PAA/fraction volumique de particules magnétiques* la suspension n'est pas déstabilisée.

Protocole On prélève 20 μL de l'émulsion V2G à la fraction volumique ϕ que l'on place dans un eppendorf de 0.5 mL. A l'aide d'un petit aimant, on prélève la phase continue que l'on remplace par une solution contenant 0.1% en masse de NP10 et $X\%$ en masse de PAA (on fait varier X entre 0 et 0.5% en masse). On mélange, puis, *sans attendre*, on dépose une goutte de volume donné (2 μL) entre lame et lamelle et on observe au microscope (grossissement 20 $\times$).

Nous avons fait varier la concentration de PAA de 0.01% en masse à 0.5% en masse et la fraction volumique de l'émulsion de 0.1% à 5%. Sur cette gamme de concentration, le pH de la solution ne varie pas et vaut 3.4 (voir Annexe 1).

Observation et résultats Le critère de stabilité est l'apparition d'agrégats⁷ (Fig.2.13).

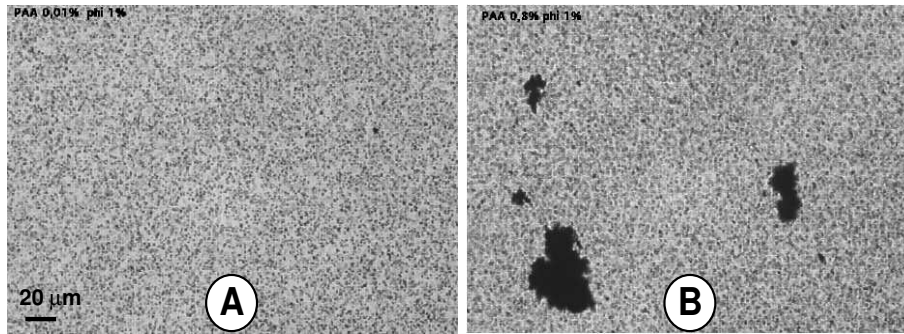


FIG. 2.13 – Variation de la concentration de PAA (A : 0.1% en masse, B : 0.3% en masse) à fraction volumique de particules constante ($\phi=1\%$) On constate la présence d'agrégats dès 0.04% en masse en PAA. On note que la taille des agrégats augmente avec la concentration en PAA. Clichés C.G.

Les résultats sont présentés sur la Fig.2.14. La ligne de transition sépare un domaine où les gouttes sont non agrégées (domaine noté L) d'un domaine où il y a coexistence d'agrégats et de gouttes "libres" (domaine noté S/L).

L'allure de ce diagramme conduit à penser que le phénomène observé a pour origine la déplétion [Bibette, 1990]. [Vrij, 1976] a décrit les interactions de

⁷Des doublets/triplets sont considérés comme des agrégats.

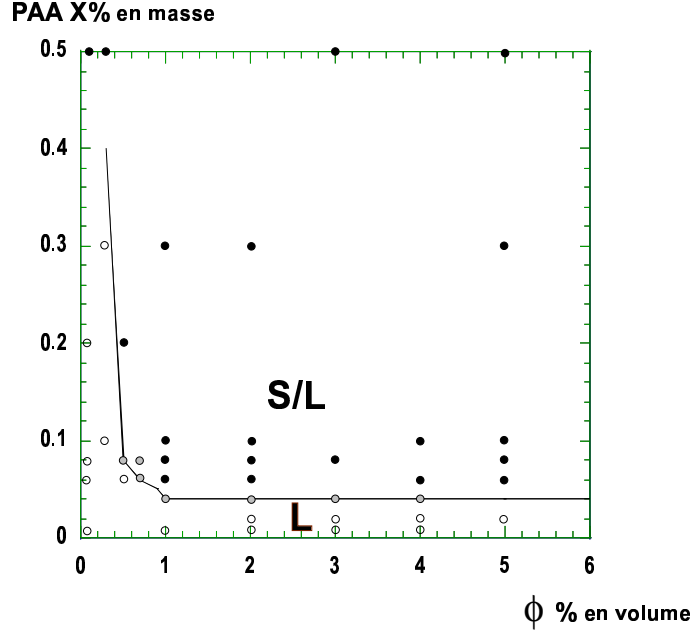


FIG. 2.14 – Diagramme concentration en PAA/fraction volumique de gouttes. La ligne de transition sépare un domaine où les gouttes sont non agrégées (domaine noté L) d'un domaine où il y a coexistence d'agrégats et de gouttes "libres" (domaine noté S/L)

déplétion et a ainsi permis d'établir l'expression de la force d'interaction⁸ :

$$f(r) = nk_B T \pi d^2 \left(1 - \frac{r^2}{4d^2} \right) \quad \text{si} \quad 2a \leq r \leq 2d$$

$$f(r) = 0 \quad \text{sinon.}$$

n est la concentration en PAA ($n = 3 \phi_{\text{poly}} / 4\pi R_g^3$), ϕ_{poly} la fraction volumique en PAA, R_g le rayon de giration du PAA, d est la somme du rayon de giration et du rayon des particules magnétiques ($d = a + R_g$) et r la distance centre à centre entre particules (Fig.2.15).

L'intégrale de la force donne l'expression de l'énergie de déplétion :

$$U_d(r) = \int_r^{2d} f(r') dr' = -\frac{4}{3} d^3 n k_B T \left(1 - \frac{3r}{4d} + \frac{r^3}{16d^3} \right)$$

Au contact ($r = 2a$), l'énergie peut être approximée⁹ par :

$$U_c \simeq -\frac{3}{2} k_B T \phi_{\text{poly}} \frac{a}{R_g}$$

⁸La force exprimée ici est légèrement supérieure à la force réelle car en toute rigueur, il faudrait tenir compte de l'adsorption du polymère sur les particules.

⁹On considère que $a \gg R_g$.

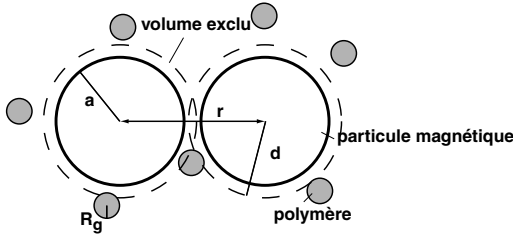


FIG. 2.15 – Origine de la déplétion : la force de déplétion est due au fait que les pelotes de polymères n'ont plus accès à l'espace entre les particules lorsque celles-ci sont proches les unes des autres. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Si on se place sur la ligne de transition par exemple $\phi=1\%$ en volume et PAA 0.04% en masse et que l'on calcule, en ce point, l'énergie de contact entre particules, on obtient :

$$U_c \simeq -3k_B T$$

où ϕ_{poly} s'écrit : $\phi_{\text{poly}} = \frac{m_T \phi}{V_T m_{\text{chaîne}}} 4/3\pi R_g^3$, m_T/V_T est la densité de la phase continue (pour une solution de PAA à 0.04% en masse, on considère que $m_T/V_T \simeq 1$) $m_{\text{chaîne}}$ est la masse d'une chaîne de polymère et ϕ est la fraction massique de polymère.

Ainsi l'énergie de contact est de l'ordre de $k_B T$, il s'agit donc bien d'un phénomène ayant pour origine la déplétion.

Cependant, si on prend une composition (PAA $X\%$ en masse, ϕ) située au-dessus de la ligne de transition (dans la zone de coexistence) et que l'on dilue, avec de l'eau pure, afin de se situer en dessous de la ligne (dans la zone de gouttes libres), on constate que les flocs sont irréversibles (Fig.2.16). Or, les agrégats dus à de la déplétion sont des agrégats réversibles, ce qui signifie qu'un autre phénomène intervient. Le mécanisme qui se produit est probablement en deux

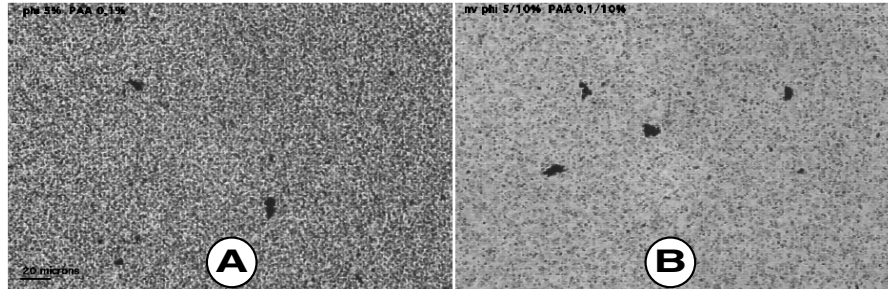


FIG. 2.16 – Illustration de l'irréversibilité des agrégats. A : PAA 0.1% $\phi=5\%$; B : diluée 10 fois dans de l'eau pure. Clichés C.G.

temps : (1) formation de flocs par déplétion, (2) pontage irréversible à l'intérieur de ces flocs.

On peut alors construire un diagramme (Fig.2.17) qui prend en compte l'aspect *thermodynamique* (formation d'agrégats par déplétion) et l'aspect *cinétique*

(formation d'agrégats irréversibles). Il existe une première ligne de transition au-dessus de laquelle les agrégats sont clairement irréversibles et une autre en dessous de laquelle il n'y a pas apparition d'agrégats. Entre ces deux zones, existe une zone dite *de transition* pour laquelle on aperçoit quelques agrégats et ces derniers semblent réversibles. Elle varie en fonction du temps d'incubation des particules dans la solution de PAA (cf. paragraphe II.2.4) : plus on attend pour diluer les agrégats et plus la ligne de transition $S_{\text{irr}}/L \leftrightarrow S_{\text{rév}}/L$ se situe à des concentrations en PAA basses. Dans notre cas, nous avons attendu *5 minutes* avant de diluer les agrégats.

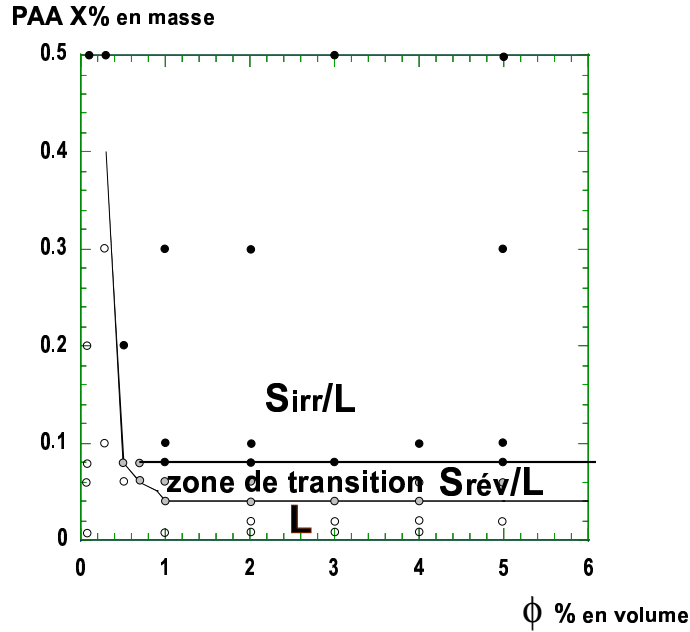


FIG. 2.17 – Diagramme concentration en PAA/fraction volumique de gouttes. La ligne de transition horizontale sépare un domaine où les gouttes sont agrégées de façon réversible d'un domaine où elles sont agrégées irréversiblement.

2.2.3 Conditions d'obtention de chaînes irréversibles

Connaissant le domaine dans lequel la suspension de particules magnétiques est stable en présence de PAA, on établit celui pour lequel on obtient des chaînes irréversibles. On souhaite qu'il n'y ait plus de particules "libres" après application du champ.

Protocole On prélève $20\mu\text{L}$ de l'émulsion V2G à la fraction volumique ϕ que l'on place dans un eppendorf de 0.5mL . A l'aide d'un petit aimant, on prélève

la phase continue que l'on remplace par une solution (NP10 0.1% en masse, PAA $X\%$ en masse). On mélange, puis on place le tube Eppendorf au coeur d'une bobine magnétique. On applique un champ de **25 mT** pendant **5 min**. On prélève alors 2 μL que l'on observe au microscope entre lame et lamelle (Fig.2.18).

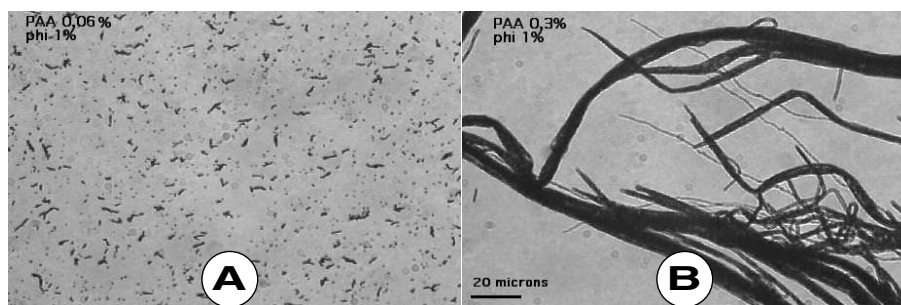


FIG. 2.18 – Variation de la quantité de PAA à ϕ constant (1%). Un champ de 25 mT est appliqué pendant 5 min. A : PAA 0.06%, toutes les particules ne sont pas agrégées ; B : PAA 0.3% : il n'y a plus de particules "libres". Des chaînes épaisses irréversibles sont formées. Clichés C.G.

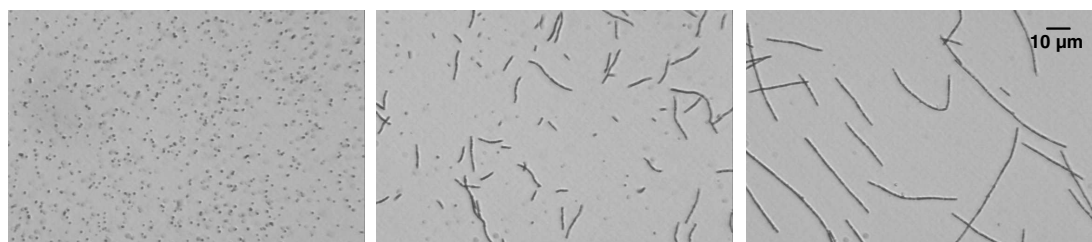


FIG. 2.19 – Evolution de la longueur des chaînes irréversibles en fonction de l'intensité du champ magnétique (de gauche à droite : 5 mT, 10 mT, 15 mT). Particules V2G (Ademtech), $\phi=0.1\%$ en volume dans une solution de PAA 0.1% en masse, NP 10 0.1% en masse. Les particules sont placées dans un tube Eppendorf au coeur d'une bobine. Le champ est appliqué pendant 5 min. Clichés C.G.

Observations et résultats La position de la ligne au-dessus de laquelle toutes les gouttes constituent des chaînes dépend de l'intensité du champ appliqué (Fig.2.19) ainsi que du temps pendant lequel on l'applique (Fig.2.20).

Choix du tensio-actif : Nous avons établi que pour obtenir des chaînes irréversibles, les particules doivent être stabilisées par un tensio-actif non ionique, le NP 10.

Les particules étant stabilisées par du Triton X405, elles sont lavées, 5 fois, avec du NP10 0.1% en masse.

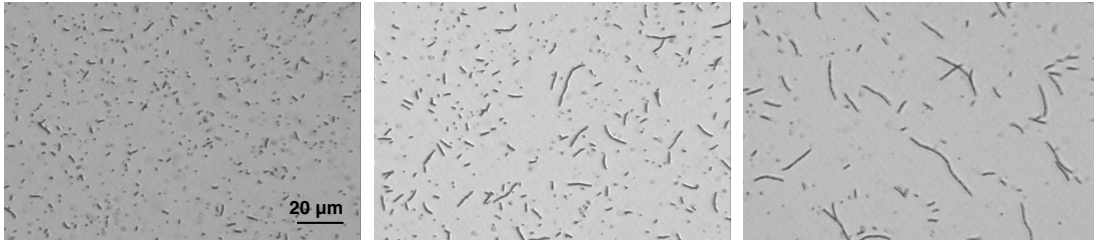


FIG. 2.20 – Evolution de la longueur des chaînes irréversibles en fonction du temps d'application d'un champ magnétique de 10 mT (de gauche à droite : 30 sec, 1 min, 2 min). Particules V2G (Ademtech), $\phi=0.1\%$ en volume dans une solution de PAA 0.1% en masse, NP 10 0.1% en masse. Les particules sont placées dans un tube Eppendorf au coeur d'une bobine. Clichés C.G.

Plus les agrégats sont gros, plus la formation de chaînes irréversibles est facile. On est donc amené à travailler dans la zone du diagramme de phase où ils sont présents. Pour obtenir des chaînes irréversibles, on se place alors dans la limite inférieure de cette zone. On choisit de travailler à une concentration de PAA de 0.1% en masse. Les quelques petits agrégats, présents à cette concentration, n'empêchent pas la formation de chaînes qui sont d'une seule particule d'épaisseur (Fig.2.21 et Fig.2.22).

A des concentrations en PAA plus élevées, les particules s'agrègent toujours sous forme de chaînes mais qui contiennent des agrégats (dont la taille augmente avec la concentration en PAA).

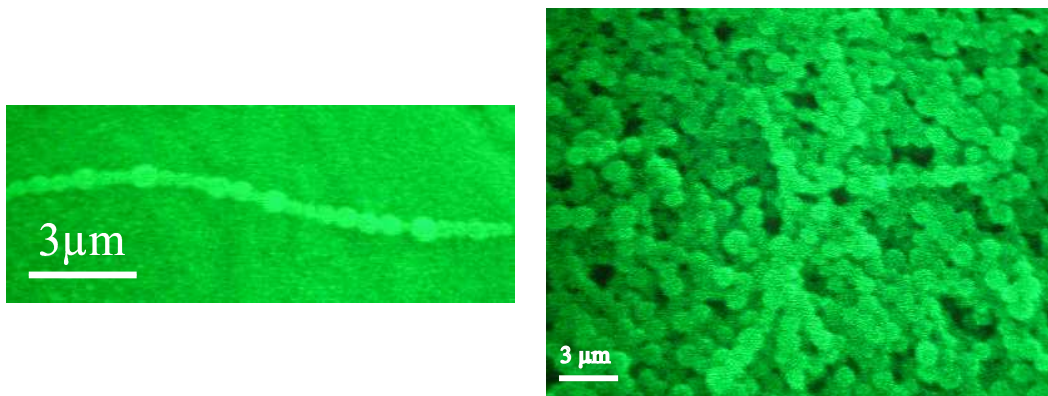


FIG. 2.21 – Clichés de MEB de chaînes magnétiques permanentes obtenues avec du PAA. Emulsion V2G, PAA 0.1% en masse, NP10 0.1% en masse. Clichés I. Génois.

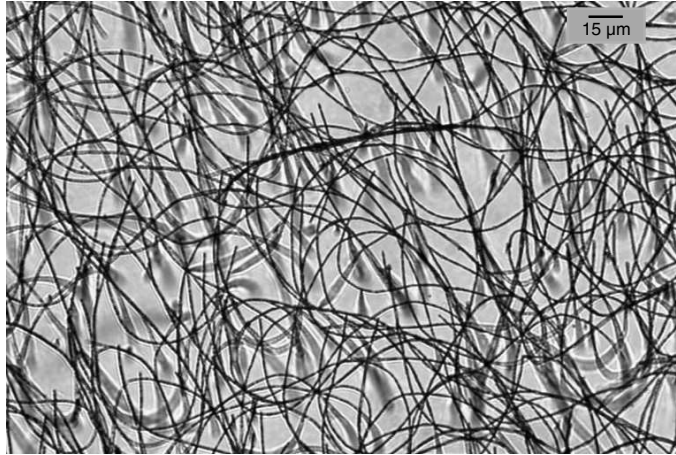


FIG. 2.22 – Longs filaments ($\phi=0.1\%$ vol) calibrés ($200\ \mu\text{m}$ de long) fabriqués avec du PAA (0.1% en masse) dans une cellule de $200\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. Clichés C.G.

Observations complémentaires

Les chaînes sont flexibles : on les voit fluctuer sous l'effet de l'agitation thermique. Stockées à température ambiante, elles sont stables plusieurs mois. On observe qu'elles deviennent de plus en plus rigides avec le temps.

2.2.4 Cinétique d'adhésion par le PAA

L'application d'un champ magnétique induit une force attractive entre les particules dont il faut tenir compte dans le profil d'interaction. Ce profil, schématisé Fig.2.23.A, présente deux minima. Le premier correspond à la formation de chaînes réversibles. Le second minimum est un puit de potentiel profond correspondant à l'agrégation irréversible des particules. Cette agrégation peut être due aux interactions de van der Waals ou au pontage des particules par des polymères.

Pour passer du premier minimum au second, il faut franchir une barrière d'énergie E_a . Cette barrière varie en fonction de l'intensité du champ magnétique : plus le champ magnétique est élevé, plus l'énergie d'activation est faible (Fig.2.23.B). On peut ainsi parler de *contrôle de l'adhésion* par le champ magnétique. Le franchissement de cette barrière est un phénomène statistique défini par un temps caractéristique τ . [Bressy, 2003] a développé une méthode permettant de déterminer expérimentalement le temps caractéristique d'un processus adhésif. Elle consiste à suivre la cinétique de formation de chaînes magnétiques permanentes obtenues par le processus que l'on souhaite étudier. Pour ce faire, les

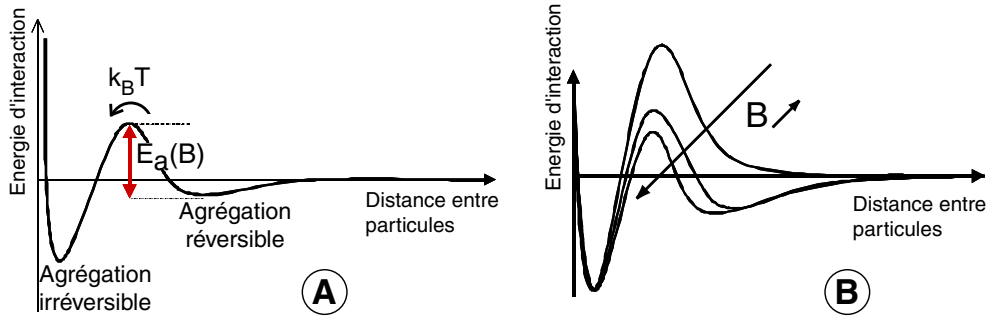


FIG. 2.23 – A : profil d'interaction entre particules en présence d'un champ magnétique. B : influence du champ magnétique sur la barrière d'énergie.

particules magnétiques sont introduites dans un capillaire de section carrée afin de contrôler la taille finale des chaînes (voir Annexe 1). On applique un champ magnétique d'intensité B pendant un temps t à une température T . B , T et t sont des variables. On mesure ensuite, par traitement d'images, la longueur des chaînes permanentes obtenues (Fig.2.24). On trace ensuite le nombre de liens obtenus en fonction du temps pour différentes températures à intensité de champ fixée puis pour différentes intensités du champ à température fixée.

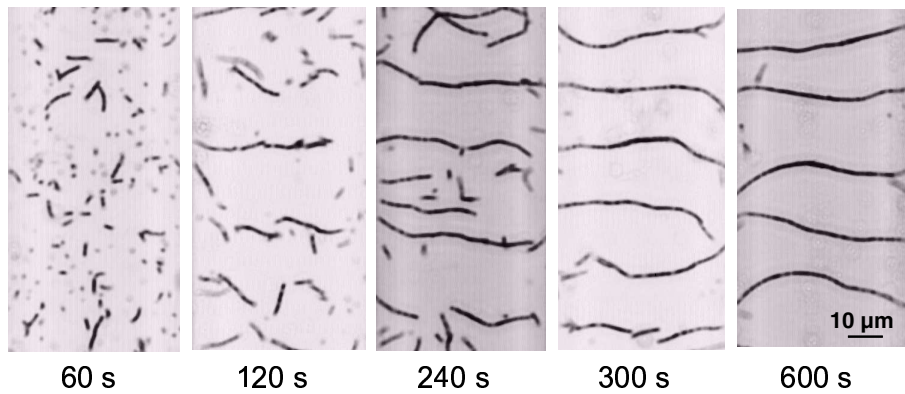


FIG. 2.24 – Croissance de chaînes permanentes en fonction du temps d'application du champ magnétique (45 mT) à 22 °C. Particules V2G (0.1% en volume) recouvertes de caséinate de sodium (0.1%) en masse). Clichés Lydie Bressy.

Par cette méthode, nous avons étudié le temps caractéristique du processus d'adhésion induit par le PAA [Cohen-Tannoudji, 2003].

Nous ne présenterons ici que les conclusions de cette étude. Pour les détails

expérimentaux se reporter à [Cohen-Tannoudji, 2003]. Nous nous plaçons dans les mêmes conditions que celles établies au II.3.3 (particules V2G, 0.1% en volume ; PAA 0.1% en masse ; NP10 0.1 % en masse). *La seule différence est le temps d'incubation* : nous laissons les particules incuber 20 h avant d'appliquer le champ afin d'être à l'équilibre d'adsorption. Sans incubation, les résultats ne sont pas reproductibles.

Ce processus d'adhésion est *thermiquement activé*. Il ne peut cependant pas être décrit par une loi de type Arrhénius qui, si elle est utilisée pour ajuster les points expérimentaux, conduit à des fréquences d'essais du franchissement de la barrière énergétique trop importantes.

Le modèle VTF (Vogel-Tammann-Fulcher) permet d'expliquer l'activation thermique de l'adhésion par le PAA. Ce modèle est utilisé pour décrire le comportement des polymères ayant une température de transition vitreuse. Le phénomène adhésif peut alors être interprété comme un pontage des particules par le PAA mais avec une *dynamique ralentie*, due au fait que le PAA adsorbé sur les particules est proche d'un état *vitreux*.

En effet, l'adsorption du polymère sur les particules conduit à une forte augmentation locale de la concentration en PAA à leur surface. Or la température de transition vitreuse d'une solution aqueuse de PAA à 75% en volume est d'environ 20 ° C (100 ° C pour un fondu de PAA).

Cette interprétation permet d'expliquer la différence de temps observée entre le système où il n'y a pas incubation et celui où elle dure 20 h. Plus le temps d'incubation est long et plus la cinétique de collage des particules entre elles est longue. Ceci s'explique par la différence de concentration du polymère à la surface des particules. Sans incubation, les surfaces sont pauvres en polymère et lorsque les particules sont comprimées à 20 ° C, le PAA est beaucoup plus éloigné d'un état vitreux.

Ces résultats confirment que c'est bien la dynamique du polymère qui est sondée et non celle des particules (dynamique de mise en chaînes¹⁰).

2.2.5 Un autre exemple de polymère adsorbé : le caséinate de sodium

L'adsorption sur les particules d'autres molécules que le PAA permettent aussi d'obtenir des chaînes irréversibles. Nous présentons ici le cas de l'adsorption de caséinate de sodium (mélange de protéines du lait, les caséines).

Nous avons repris le protocole de fabrication développé par [Bressy, 2003] qui a étudié la cinétique de formation de ces chaînes permanentes : ce processus est également activé par la température et par le champ magnétique.

¹⁰De l'ordre de quelques secondes pour les particules (0.75 μ m de diamètre) et les intensités de champs magnétiques que nous utilisons (10 – 50 mT).

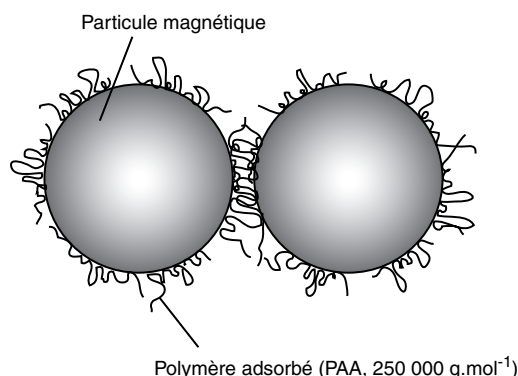


FIG. 2.25 – Molécules de polymère adsorbées sur des particules magnétiques.

Comme précédemment, on utilise l'émulsion V2G ($\phi = 0.1\%$ en volume) lavée avec une solution de NP10 0.1% en masse. On lave une fois l'émulsion avec une solution de caséinate de sodium 0.1% en masse, NP10 0.1% en masse et on laisse incuber une heure afin de permettre l'adsorption des protéines à l'interface. Par observation au microscope, on s'assure que l'émulsion ainsi obtenue n'est pas déstabilisée.

L'application d'un champ magnétique conduit à la formation de chaînes permanentes comme le montre la Fig.2.26.

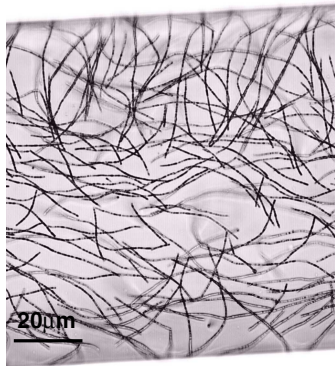


FIG. 2.26 – Chaînes magnétiques permanentes obtenues avec du caséinate de sodium à 0.1% en masse. Emulsion V2G, ϕ 0.1% en volume, NP10 0.1% en masse. Un champ de 46 mT est appliqué pendant 10 min à 50°C dans un capillaire de section carrée 200 μm scellé avec une colle qui réticule sous UV. Cliché CG.

Il est beaucoup plus facile de former des chaînes permanentes avec des protéines qu'avec des polymères. En effet, les filaments magnétiques peuvent être obtenus dans une large gamme de concentrations en protéines alors que la fenêtre de concentration (PAA, fraction de particules) est étroite. De plus, très peu de polymères permettent de réaliser ces chaînes : le PAA est le seul connu à ce jour. Il est évident qu'une protéine qui comporte des zones hydrophiles et hydrophobes s'adsorbe de façon différente des homopolymères.

2.3 Collage magnéto-stimulé : interactions spécifiques biologiques

De même qu'au paragraphe 2.2, nous voulons contrôler l'adhésion de particules par un champ magnétique. Dans ce qui suit, le collage n'est plus réalisé grâce à des polymères adsorbés mais grâce à une construction spécifique antigène/anticorps.

Pour obtenir des chaînes permanentes, un antigène doit être *pris en sandwich* par deux anticorps greffés sur deux particules magnétiques comme schématisé Fig.2.27.A.

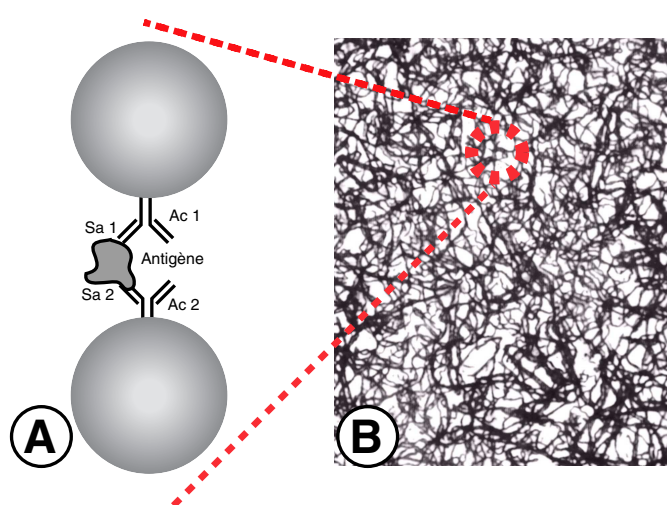


FIG. 2.27 – A : illustration du sandwich : anticorps/antigène/anticorps permettant de lier des particules entre elles. L'antigène possède des sites antigéniques notés Sa_i spécifiques des anticorps Ac_i . B : particules (ADEMTECH, lot EPN) greffées avec un IgG polyclonal anti-humain facteur de von Willebrand. Si on ajoute du plasma humain contenant le facteur de von Willebrand en forte quantité, toutes les particules s'agrègent sous forme de chaînes après application d'un champ magnétique (plasma contenant $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vWF, champ de 70 mT appliqué pendant 5 min). Ces chaînes persistent une fois le champ magnétique annulé. Cliché C.G.

Il est rare qu'un antigène possède plusieurs sites antigéniques identiques permettant l'utilisation d'un anticorps monoclonal. Pour réaliser le sandwich anticorps/antigène/anticorps, nous avons utilisé deux approches : (i) l'emploi d'un anticorps polyclonal (Fig.2.27.B), (ii) l'utilisation de deux anticorps monoclonaux¹¹.

¹¹Soit les deux anticorps sont mélangés puis greffés sur les particules, soit deux lots de particules sont greffés avec un type d'anticorps chacun.

Couples antigène/anticorps :

- (i) : IgG anti-vWF humain/vWF humain/IgG anti-vWF humain
- (ii) : IFN- γ anti-souris (clone R4-6A2)/IFN- γ de souris/IFN- γ anti-souris (clone XMG1.2)

Toute la difficulté de la décoration des particules avec des anticorps réside dans le fait que celles-ci doivent être stables en l'absence de champ magnétique ou après application d'un champ si l'*antigène* est *absent*. De plus, afin d'obtenir des chaînes irréversibles parfaitement linéaires, les particules doivent s'agréger en présence d'antigène *seulement après* l'application d'un champ magnétique suffisant (Fig.2.29).

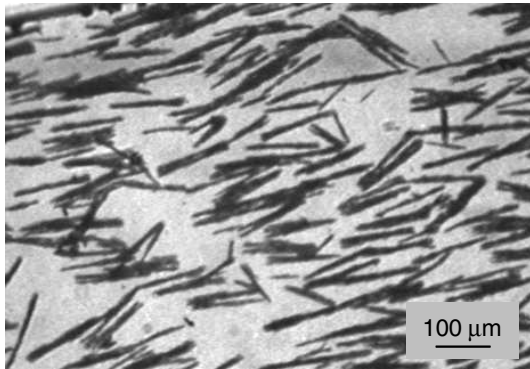


FIG. 2.28 – Particules greffées instables sous champ magnétique (Uptibeads Streptavidine, ref : UPR09020, 0.88 μm de diamètre, concentration mère). Un champ de 20 mT est appliqué sur l'échantillon (non dilué) pendant 2 min. Cliché pris une fois le champ magnétique annulé. Cliché C.G.

Le greffage de protéines à la surface de particules ainsi que l'utilisation de tampons salins ou de milieux biologiques (plasma) vont modifier les portées des interactions. Il convient donc de *maîtriser* la stabilité des particules au cours du greffage, et lors de la mise en présence de l'antigène¹².

On rappelle (voir paragraphe 1.2.3) que l'on doit également contrôler l'orientation de l'anticorps ainsi que la quantité greffée. Le premier point est crucial pour la fonctionnalité de l'anticorps. Le second joue (i) sur l'accessibilité de l'anticorps (s'ils sont trop près les uns des autres, ils ne vont pas pouvoir se lier correctement à l'antigène pour cause de gêne stérique) et (ii) sur la stabilité des particules comme le montre la Fig.2.28. Sur ce cliché, on observe qu'après application d'un champ magnétique sur des particules greffées avec de la streptavidine, celles-ci restent organisées sous forme de bâtonnets, signe de leur mauvaise stabilité. Les protéines greffées sur les particules changent la charge de surface de celles-ci ce qui peut perturber leur stabilité. Ainsi des particules, recouvertes de protéines placées dans un milieu dont le pH est égal au pI des protéines, sont presque neutres et donc généralement instables.

¹²L'antigène peut être soit purifié, soit contenu dans un milieu biologique, comme c'est le cas dans l'exemple présenté (antigène contenu dans du plasma humain).

Le protocole de greffage des anticorps que nous avons élaboré et les conditions d'obtention des chaînes irréversibles sont détaillés en Annexe 3.

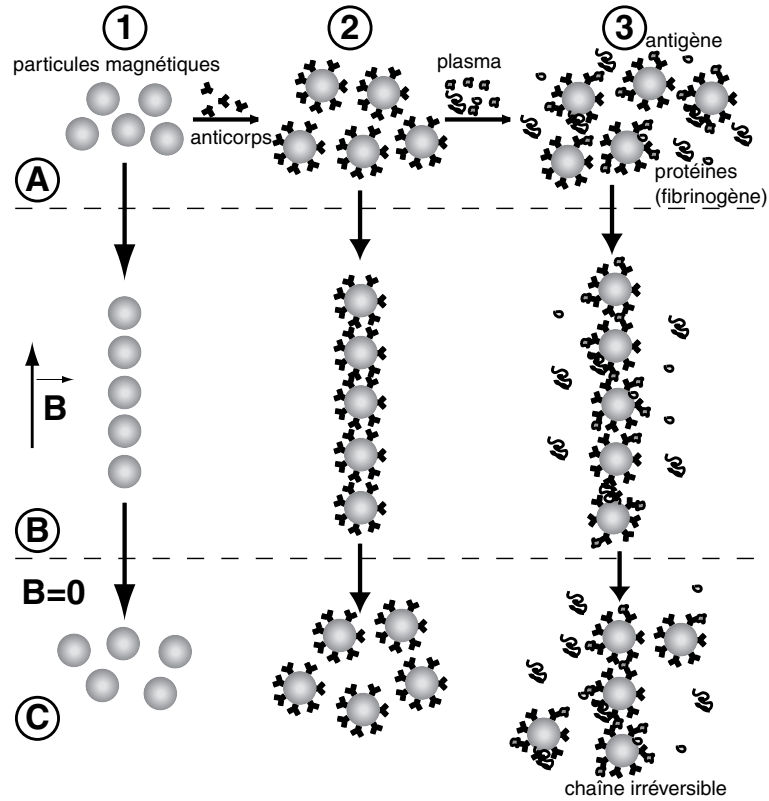


FIG. 2.29 – Principe d'obtention de chaînes irréversibles : il faut partir d'un échantillon de particules magnétiques stables c'est-à-dire qui se redispersent après annulation du champ magnétique (1A,B,C). On greffe des protéines (des IgG) sur les particules. Le greffage ne doit pas affecter la stabilité des particules (2A,B,C). Les particules greffées sont ensuite mises en présence des antigènes (contenus par exemple dans du plasma). On laisse les antigènes réagir avec les anticorps présents sur les particules. Après application d'un champ magnétique, les particules s'agrègent sous forme de chaînes (3C). On formule le système afin qu'il n'y ait aucune agrégation sans champ magnétique (3A) c'est-à-dire que les interactions entre particules doivent être répulsives et que seul le champ magnétique permet de franchir la barrière d'énergie. Les forces répulsives entre particules fonctionnalisées avec les anticorps (en l'absence d'antigène- 2A,B,C) doivent donc être grandes et l'ajout des antigènes ne doit pas perturber fortement cette stabilité. Il faut également limiter l'adsorption des protéines telles que le fibrinogène qui va induire des interactions non spécifiques.

L'antigène est introduit *avant* l'application du champ magnétique. Il faut attendre qu'il ait réagi avec les anticorps présents sur les particules avant d'appliquer le champ. Ce temps d'attente dépend des interactions antigènes/anticorps

greffés sur des particules. Le système est formulé de telle sorte que les interactions entre les particules magnétiques, recouvertes d’anticorps dont certains sont liés à des antigènes, soient répulsives. Ainsi, pratiquement aucune agrégation entre particules n’est visible en l’absence de champ. Par application du champ magnétique, on rapproche les particules magnétiques les unes des autres et on attend que la réaction antigène/anticorps s’effectue. Intuitivement, ce temps d’attente varie selon la liberté de mouvement de l’anticorps, donc, notamment, selon la concentration d’anticorps à la surface et la longueur du bras espaceur entre l’anticorps et la particule.

Dans notre cas, le vWF (antigène) est incubé 5 min avec les particules magnétiques greffées avec des IgG anti-vWF (anticorps) et l’on applique ensuite un champ de 70 mT pendant 5 min.

Le *rapport* des quantités antigènes/anticorps est primordial : si les antigènes sont en excès alors ils vont saturer les surfaces des particules qui ne vont alors plus pouvoir se lier. Les méthodes développées pour quantifier les anticorps greffés sont présentées en Annexe 4.

Pour la suite, nous avons besoin de former un *lien unique* entre les particules afin d’étudier la micromécanique d’un complexe anticorps/antigène/anticorps. Il faut alors régler la densité de protéines à la surfaces des particules en fonction de la longueur des liens et de la distance entre les particules (Fig.2.30).

Une des applications de ce type d’assemblages concerne le diagnostic immunologique basé sur le principe des tests d’agglutination [Baudry et al., 2004]. Le nombre de particules impliquées dans les agrégats est directement relié à la concentration d’antigènes présents dans l’échantillon à analyser (voir paragraphe I.1.2).

2.4 Décoration des chaînes

Les chaînes magnétiques présentées précédemment constituent de nouveaux matériaux. Leur fonctionnalisation les rend intéressantes pour un grand nombre d’applications telles que l’analyse, l’isolation et/ou la préparation d’espèces.

2.4.1 Couches de polyélectrolytes

Si le polymère, adsorbé sur les particules, est un polyélectrolyte, on peut changer à façon la charge de la chaîne magnétique : un polyélectrolyte de charge opposée va alors se fixer sur la chaîne en effectuant une “inversion de charge”. On peut ainsi faire des dépôts couche par couche [Decher, 1997] et ce faisant, fonctionnaliser des surfaces.

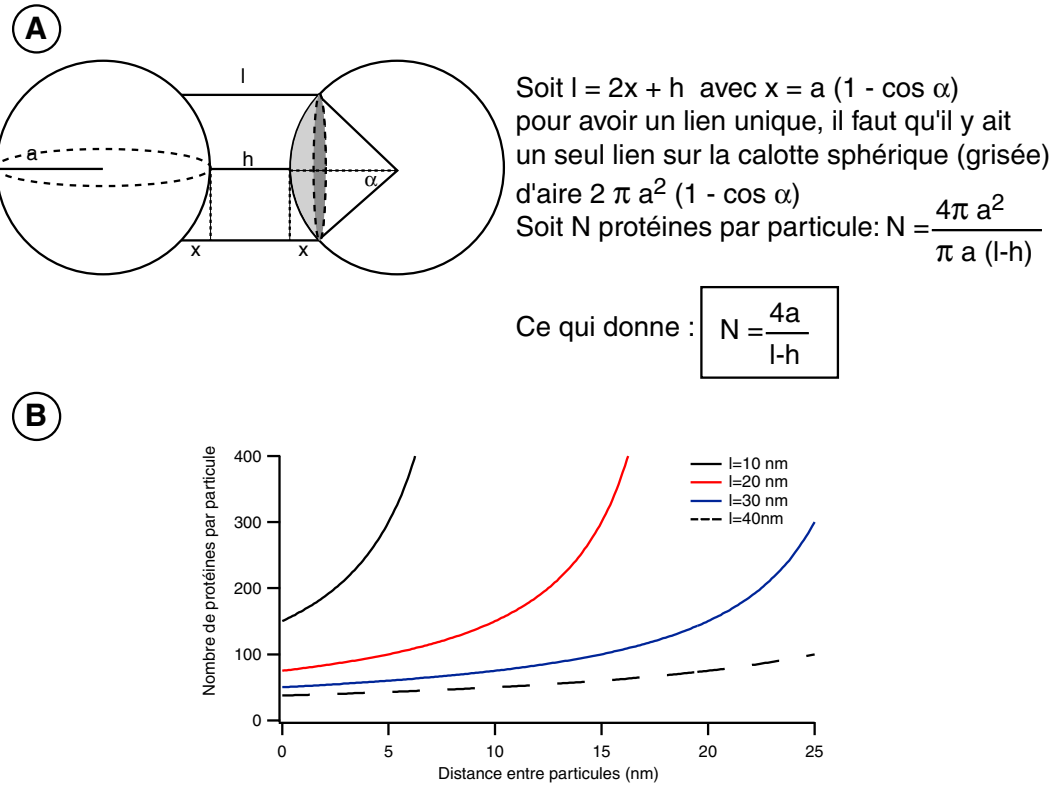


FIG. 2.30 – A : calcul du nombre N de protéines par particule afin d'obtenir un lien unique en fonction de la distance h entre particules (bord à bord) ; B : variation du nombre de protéines par particule afin d'obtenir un lien unique en fonction de la distance entre particules. Variations calculées pour différentes longueur l de lien (rayon a des particules pris égal à 375 nm).

Ainsi, lorsque l'on forme des chaînes permanentes avec du PAA dans un capillaire¹³, on peut ensuite introduire un polycation comme par exemple la poly-L-lysine ($pK_A \simeq 10.2$). L'utilisant de poly-L-lysine fluorescente permet d'observer sa fixation sur des chaînes permanentes obtenues avec du PAA (Fig.2.31). L'introduction de la poly-L-lysine peut se faire par capillarité ou via un champ électrique.

La poly-L-lysine est couramment utilisée en biologie pour fixer des objets sur des lames de verre (puce à ADN génomique par exemple). On peut alors imaginer l'utiliser pour fixer de l'ADN sur nos chaînes. En ajoutant de l'ADN à la suspension de chaînes, celui-ci se fixe en certains points de leur surface. La concentration d'ADN sur les chaînes peut être variée grandement en jouant sur sa concentration et sur sa taille. Dans la Fig.2.35, peu (une en moyenne) de molécules

¹³Il est préférable d'introduire la poly-L-lysine lorsque les chaînes sont organisées dans un capillaire afin d'éviter que ce polycation ne les collent entre elles.

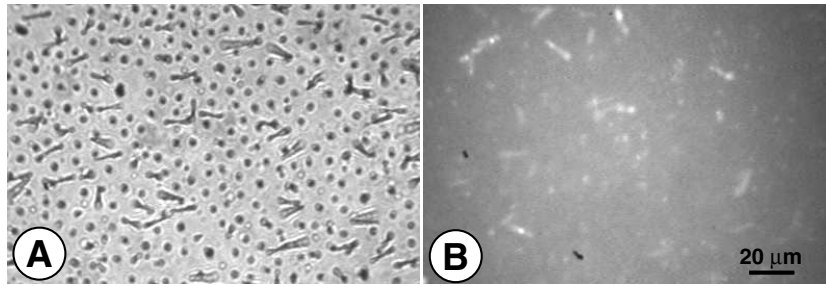


FIG. 2.31 – A : chaînes magnétiques permanentes obtenues avec du PAA (émulsion V2G, Ademtech) avant introduction de poly-L-lysine. B : visualisation de la poly-L-lysine-FITC introduite à l'aide d'un champ électrique. L'observation est effectuée en épifluorescence sur un microscope Zeiss Axiovert 100 équipé d'une lampe à mercure pour l'excitation et d'un objectif 100X. La source au mercure est filtrée à $\lambda = 450\text{--}490\text{ nm}$ et l'observation se fait à $\lambda = 510\text{--}550\text{ nm}$. Clichés C.G.

d'ADN de grande taille (phage λ , 48.5 kpb) est fixée par chaîne. Fig.2.33 la chaîne est entièrement recouverte d'ADN courts (mélange "PhiX174").

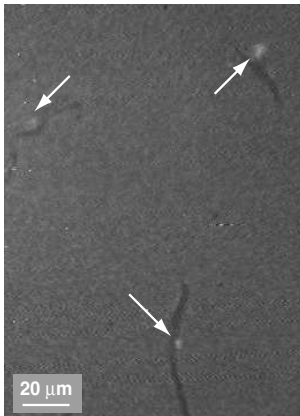
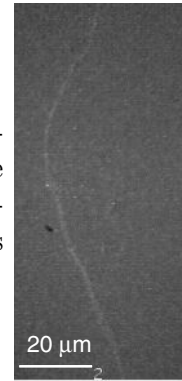


FIG. 2.32 – Molécules d'ADN de phage λ , marquées avec l'intercalant YOYO-1, fixées sur des chaînes permanentes obtenues avec du PAA puis recouvertes de poly-L-lysine. L'observation est effectuée dans les mêmes conditions que pour la Fig.4.1. Cliché C.G.

2.4.2 Décoration par couplage covalent

Les chaînes, obtenues par collage magnéto-stimulé de particules recouvertes de PAA, portent des fonctions COOH provenant de ce dernier. Ces groupes peuvent servir à greffer des protéines, via leurs fonctions NH_2 , sur les chaînes

FIG. 2.33 – Chaîne (obtenue avec du PAA puis recouverte de poly-L-lysine) recouverte d'un mélange d'ADN courts de type "PhiX174" marqués avec l'intercalant YOYO-1. L'observation est effectuée dans les mêmes conditions que pour la Fig.4.1. Cliché C.G.



[Hermanson, 1996] [Williams and Ibrahim, 1981]. La difficulté de ce type de greffage est de conserver des chaînes uniques, non enchevêtrées et non couplées. Le champ magnétique utilisé doit alors être *faible* (~ 10 mT).

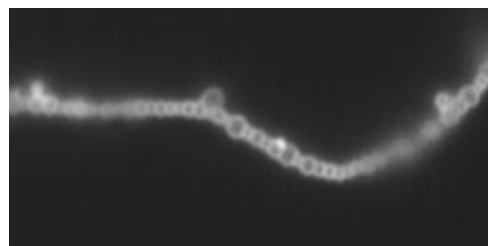
Greffage d'anticorps On a ainsi greffé des IgG de souris anti-CD3. Ce sont des anticorps dirigés contre les lymphocytes T (CD3+). Afin de révéler le greffage, on utilise des anticorps secondaires fluorescents (anti-souris Alexa 488 IgG) dirigés spécifiquement contre ceux greffés (Fig.34).

Le protocole de greffage et les études concernant la spécificité de l'anticorps secondaire, la stabilité du greffage, le dosage des anticorps greffés et la minimisation des interactions non-spécifiques sont présentés en Annexe 2.

En résumé, on montre (i) que l'on peut greffer $1/6^{\text{ème}}$ de monocouche, sans optimisation du protocole, (ii) que le greffage reste stable au moins une semaine et (iii) qu'il est préférable d'utiliser une solution de BSA 0.5% en masse pour laver les chaînes une fois greffées afin de diminuer les interactions non-spécifiques.

Ce travail a été l'objet du stage de 3^{ème} année de l'ESPCI de Florence Thivilliers.

FIG. 2.34 – Filament constitué de particules magnétiques (Adembeads, diamètre $0.75\mu\text{m}$) recouvertes de PAA, greffé avec un IgG de souris anti-CD3. Il est marqué avec de l'anti-souris IgG Alexa 488. L'observation est effectuée en épifluorescence sur un microscope Nikon Eclipse TE 300 équipé d'une lampe à mercure pour l'excitation et d'un objectif 100 $\times$. La source au mercure est filtrée à $\lambda = 450\text{-}490$ nm et l'observation se fait à $\lambda = 510\text{-}550$ nm. Cliché C.G.



Le chapitre 4 de cette thèse illustre l'utilisation de tels filaments comme matrice de séparation pour le tri de cellules rares en microcanaux.

Greffage d'enzyme Nous avons aussi montré qu'il est possible de greffer de la trypsine sur des chaînes permanentes.

La trypsine est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques. Elle est utilisée pour obtenir un extrait peptidique des protéines permettant leur identification sur la base de banques de données génomiques et protéomiques. Cette enzyme est particulièrement intéressante car les sites de coupure du côté C-terminal des lysine et arginine sont assez fréquents, ce qui conduit à une digestion homogène de la protéine et à l'obtention de fragments de taille adaptée à la gamme de masse des spectromètres de masse utilisés.

Nous avons mesuré l'activité de l'enzyme afin de vérifier l'efficacité du greffage. Pour ce faire, nous avons fait réagir l'enzyme avec un substrat (BAPNA ou Benzoyl- L Arginine- Para NitroAniline) qui libère une molécule colorée (p-nitroaniline) dont on mesure la concentration avec un spectrophotomètre ($\lambda=405$ nm). Les tests effectués (voir Annexe 2) mettent en évidence (i) qu'il

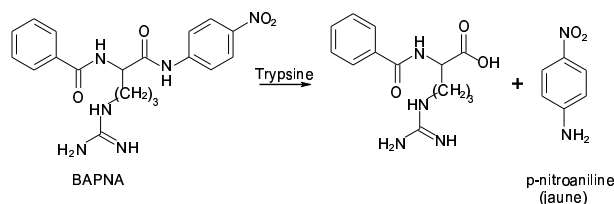


FIG. 2.35 – Réaction de dosage de l'activité de la trypsine par utilisation d'un substrat (BAPNA) qui libère une molécule colorée (jaune).

est préférable de greffer la trypsine en présence de NP10 0.1% en masse ou de Triton X405 0.3% en masse (ii) qu'il a été possible de greffer de la trypsine sur des chaînes permanentes mais qu'elles se sont emmêlées et que beaucoup d'entre elles ont été perdues lors des différents lavages. Nous n'avons fait que montrer la faisabilité du greffage et nous n'avons pas cherché à l'optimiser.

Ce travail a été effectué en collaboration avec Zuzana Bilkova¹⁴, lors de son stage post-doctoral à l'Institut Curie dans le Laboratoire Macromolécules et Microsystèmes pour la Biologie et la Médecine.

2.5 Collage “post-organisation”

Ce qui va suivre est plus anecdotique car nous n'avons pas exploité les filaments présentés dans ce paragraphe. Il convient toutefois d'illustrer les différentes voies d'obtention de chaînes permanentes. Il s'agit ici d'organiser les particules sous forme de chaînes dans un microcanal, puis d'introduire l'agent pontant à

¹⁴PhD - Assist. Prof. Department of Biological and Biochemical Sciences Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, République tchèque.

l'image de ce qui est proposé dans [Furst et al., 1998]. L'agent pontant est un polymère qui vient s'adsorber sur les chaînes. Nous illustrons cette méthode avec deux exemples : le poly(diméthyl acrylamide) (ou PDMA) et la poly-L-lysine.

2.5.1 Le PDMA

Le PDMA est utilisé en électrophorèse pour éliminer les flux électro-osmotiques nuisant à la reproductibilité des séparations. Nous l'utilisons à cette fin dans nos microcanaux pour séparer de l'ADN en taille à travers un réseau de particules (voir paragraphe I.1.4). Ce polymère est synthétisé à l'Institut Curie par Valessa Barbier [Barbier, 2002].

Les microcanaux sont préparés par moulage de PDMS (polydiméthylsiloxane) selon [Xia and Whitesides, 1998] (voir Annexe 6). On laisse incubé 40 min une solution de PDMA à 0.15% en masse dans les microcanaux. On rince ensuite avec de l'eau distillée. On place le microcanal au cœur d'une bobine posée sur la platine d'un microscope. Les particules magnétiques (lot V2G, ADEMTECH) sont alors introduites et organisées en un réseau de colonnes.

Nous avons observé qu'au bout de 2 à 3 heures¹⁵, le polymère se désorbe et vient sur les colonnes. Quand le champ magnétique est annulé, on observe des colonnes permanentes, parfois même attachées aux parois du canal.

2.5.2 La poly-L-lysine

On peut également utiliser un polyélectrolyte, tel la poly-L-lysine, qui s'adsorbe rapidement sur les particules une fois organisées sous forme de chaînes. Avec un champ magnétique, on organise préalablement les particules magnétiques sous forme de chaînes dans un capillaire, puis on introduit la poly-L-lysine par capillarité. Lorsque l'on annule le champ, on observe des chaînes permanentes (Fig.2.36).

Ce polypeptide est un polycation à pH neutre (pK_A 10.2), il peut également être introduit à l'aide d'un champ électrique, ce qui est moins destructeur pour les chaînes qu'un flux hydrodynamique.

2.6 Conclusions et perspectives

Nous avons développé différentes méthodes pour obtenir des chaînes permanentes. Nous avons également montré qu'il est possible d'obtenir des chaînes plus élaborées, décorées à façon avec des anticorps, des ADN, des enzymes. Ces travaux (exceptée l'obtention de chaînes irréversibles à l'aide d'interactions spécifiques) ont donné lieu à un dépôt de brevet [Viovy et al., 2002].

¹⁵[Bancaud, 2000] a estimé que la durée d'efficacité du revêtement de surface (avec le PDMA) était du même ordre de grandeur.

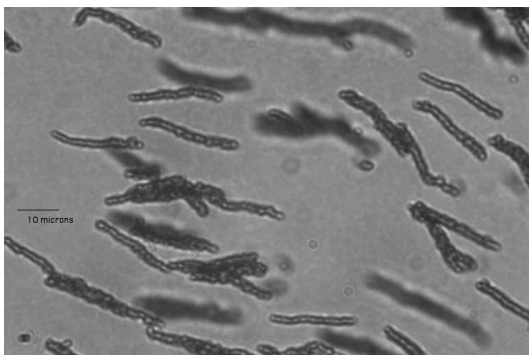


FIG. 2.36 — Chaînes obtenues par ajout de poly-L-lysine introduite par capillarité une fois les colonnes organisées entre lame et lamelle. Cliché C.G.

Dans les chapitres suivants nous présentons deux applications de ces chaînes permanentes. Une des applications consiste à plier les filaments, à l'aide d'un champ magnétique, pour sonder les propriétés micromécaniques des liens entre les particules. L'autre porte sur l'utilisation des chaînes décorées avec les anticorps, comme matrice pour séparer des cellules dans des microcanaux.

Bibliographie

- [Bancaud, 2000] Bancaud, A. (2000). Electrophorèse capillaire d'ADN dans un réseau d'obstacles superparamagnétiques. DEA Physique des Liquides, Université Paris 6.
- [Barbier, 2002] Barbier, V. (2002). *Développement, étude et applications de nouvelles matrices intelligentes pour l'analyse automatisée d'ADN par électrophorèse : séquençage, cartographie et diagnostic*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Baudry et al., 2004] Baudry, J., Bertrand, E., Rouzeau, C., Greffier, O., Koenig, A., Dreyfus, R., Cohen-Tannoudji, L., Goubault, C., Bressy, L., Vincent, L., Lequeux, N., and Bibette, J. (2004). Colloids for studying molecular recognition. *Annales de Chimie*.
- [Bibette, 1990] Bibette, J. (1990). *Interactions de déplétion et équilibre fluide-solide des émulsions*. PhD thesis, Université de Bordeaux I.
- [Biswal and Gast, 2003] Biswal, S. and Gast, A. (2003). Mechanics of semiflexible chains formed by poly(ethylene glycol)-linked paramagnetic particles. *Phys. Rev. E*, 68 :21402.
- [Bressy, 2003] Bressy, L. (2003). *Elasticité et adhésion du caséinate adsorbé aux interfaces*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Cohen-Tannoudji, 2003] Cohen-Tannoudji, L. (2003). Adhésion colloïdale induite par des polymères adsorbés. DEA Matière Condensée, Université Paris 6.
- [Decher, 1997] Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies : toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277 :1232.
- [Dimitrova, 2000] Dimitrova, T. (2000). *Protein-stabilized Emulsions : Colloid Forces, Rheology and Creaming*. PhD thesis, Université Bordeaux I.
- [Fermigier and Gast, 1992] Fermigier, M. and Gast, A. (1992). Structure evolution in a paramagnetic latex suspension. *J. Colloid Interface Sci.*, 154(2) :522.
- [Furst and Gast, 2000] Furst, E. and Gast, A. (2000). Dynamics and lateral interactions of dipolar chains. *Phys. Rev. E*, 62 :6916.
- [Furst et al., 1998] Furst, E., Suzuki, C., Fermigier, M., and Gast, A. (1998). Permanently linked monodispers paramagnetic chains. *Langmuir*, 14 :7334.

- [Halsey and Toor, 1990] Halsey, T. and Toor, W. (1990). Structure of electro-rheological fluids. *Phys. Rev. Lett.*, 65 :2820.
- [Hermanson, 1996] Hermanson, G. (1996). *Bioconjugate techniques*.
- [Hiddessen et al., 2000] Hiddessen, A., Rodgers, S., Weitz, D., and Hammer, D. (2000). Assembly of binary colloidal structures via specific biological adhesion. *Langmuir*, 16 :9744.
- [Mann et al., 2000] Mann, S., Shenton, W., Li, M., Connolly, S., and Fitzmaurice, D. (2000). Biologically programmed nanoparticle assembly. *Adv. Mater.*, 12(2) :147.
- [Melle, 2002] Melle, S. (2002). *Dynamics in MR suspensions subject to external fields by means of optical techniques : aggregation processes, structure formation and temporal evolution*. PhD thesis.
- [Mirkin, 2000] Mirkin, C. (2000). Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks. *Inorg. Chem.*, 39 :2258.
- [Nam et al., 2002] Nam, J.-M., Park, S.-J., and Mirkin, C. (2002). Bio-barcode based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 :3820.
- [Philip et al., 1997] Philip, J., Mondain-Monval, O., Leal-Calderon, F., and Bibette, J. (1997). Colloidal force measurements in the presence of a polyelectrolyte. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 30 :2798.
- [Philip et al., 1999] Philip, J., Mondain-Monval, O., Leal-Calderon, F., and Bibette, J. (1999). Forces between colloidal droplets in the presence of a weak polyelectrolyte. *Bull. Mater. Sci.*, 22(3) :313.
- [Promislow et al., 1995] Promislow, H., Gast, A., and Fermigier, M. (1995). Aggregation kinetics of paramagnetic colloidal particles. *J. Chem. Phys.*, 102(13) :5492.
- [Pérez-Castillo et al., 2000] Pérez-Castillo, I., Pérez-Madrid, A., Rubi, J., and Bossis, G. (2000). Chaining in magnetic colloids in the presence of flow. *J. Chem. Phys.*, 113(15) :6443.
- [Singer and Plotz, 1956] Singer, J. and Plotz, C. (1956). Latex fixation test. 1. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, 21 :888.
- [Viovy et al., 2002] Viovy, J.-L., Bibette, J., Goubault, C., and Dutreix, M. (2002). Chaînes colloïdales irréversibles porteuses de sites de reconnaissance, leur procédé de préparation et application à des fins de détection d'espèces. *Brevet*, page FR 02 02231.
- [Vrij, 1976] Vrij, A. (1976). Polymer at interfaces and interactions in colloidal dispersions. *Pure Appl. Chem.*, 48 :471.

- [Williams and Ibrahim, 1981] Williams, A. and Ibrahim, I. (1981). A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent EDC. *J. Am. Chem. Soc.*, 103 :7090.
- [Xia and Whitesides, 1998] Xia, Y. and Whitesides, G. (1998). Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 37 (5) :551.
- [Zhang and Widom, 1995] Zhang, H. and Widom, M. (1995). Field-induced forces in colloidal particle chains. *Phys. Rev. E*, 51(3) :2099.

En guise de préambule...

... au Chapitre 3

Une nouvelle technique permettant de sonder la rigidité de flexion à l'échelle moléculaire est ici introduite.

Les longs filaments flexibles, présentés au Chapitre précédent, adoptent une conformation en épingle à cheveux lorsqu'ils sont soumis "brusquement" à un champ magnétique de direction perpendiculaire à la leur. Les mesures du rayon de courbure de ces épingles en fonction de l'intensité du champ par microscopie optique d'une part, et de la longueur du lien par diffusion de la lumière d'autre part, permettent de déterminer la rigidité de flexion du lien qui relie les particules magnétiques.

Cette méthode présente l'avantage d'étudier de très petits objets (quelques nanomètres) par une approche macroscopique car c'est la déformation du filament qui est observée optiquement et non celle du lien.

Deux types de liens sont présentés : un polymère adsorbé (le PAA) et un sandwich anticorps/antigène/anticorps.

La difficulté, décrite au Chapitre 2, réside dans l'obtention de ces longs filaments, d'une seule particule de diamètre et ayant un nombre de liens contrôlé.

Chapitre 3

Filaments magnétiques flexibles

Comme nous l'avons souligné dans le premier chapitre, les colloïdes magnétiques sont utilisés dans diverses applications. Ils peuvent aussi bien servir à capturer et isoler des objets biologiques [Müller-Schulte et al., 1997], qu'à appliquer des forces à des molécules d'ADN [Strick et al., 1996] ou bien mesurer directement des profils force/distance entre colloïdes [Leal-Calderon et al., 1994].

En assemblant de façon permanente les colloïdes magnétiques à l'aide de liens, nous avons obtenu de nouveaux matériaux, de longs filaments magnétiques flexibles (voir Chapitre 2), qui ouvrent de nouveaux champs d'applications. Ces filaments combinent deux propriétés : (i) constitués de colloïdes magnétiques, ils répondent rapidement à un champ magnétique (ii) ils présentent les propriétés élastiques des chaînes à longueur de persistance (*worm-like chains*). Ainsi, placés sous un champ magnétique, les filaments adoptent une configuration métastable en forme d'épingle à cheveux qui dépend de leur longueur et de la nature du lien.

La quasi-totalité des travaux effectués sur des assemblages magnétiques consistent à étudier la formation [Melle et al., 2002] ainsi que les propriétés mécaniques [Furst and Gast, 1999] de chaînes magnétiques *réversibles*. Seul le groupe d'A. Gast [Biswal and Gast, 2001] s'est penché sur les propriétés mécaniques de chaînes *irréversibles* : les déformations des chaînes induites par les fluctuations thermiques sont observées par vidéo-microscopie. Leur module élastique est déterminé à l'aide de pinces optiques.

En étudiant le comportement sous champ de nos chaînes, nous avons développé une nouvelle technique permettant de mesurer leur élasticité. Après avoir décrit le comportement observé sous champ des chaînes magnétiques (Fig.3.1), nous en ferons une description théorique. Nous montrerons enfin que ces chaînes constituent un nouvel outil de caractérisation micromécanique. Ils permettent la mesure de l'élasticité des liens qui pontent les colloïdes. Ces liens peuvent être de nature diverse : des polymères adsorbés ou des complexes biologiques greffés de type anticorps-antigène-anticorps.

Ce travail a été effectué en collaboration avec le professeur Marc Fermigier, Pierre Jop (stage de D.E.A.) et Caroline Derec (A.T.E.R.) du Laboratoire "Phy-

sique et Mécanique des Milieux Hétérogènes” (PMMH, UMR 7636/ESPCI, Paris).

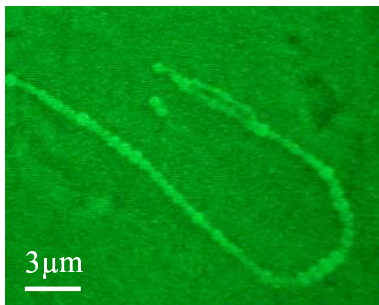


FIG. 3.1 – Chaîne magnétique irréversible obtenue avec du PAA (Emulsion V2G, ADEMTECH, diamètre $0.75\ \mu\text{m}$). Cliché de MEB (I. Géniois). L'échantillon est préalablement séché à l'air libre en présence d'un champ magnétique.

3.1 Flexibilité des filaments magnétiques

Les chaînes magnétiques irréversibles ou *filaments* sont constituées de particules superparamagnétiques calibrées et assemblées par des liens. Ces liens peuvent être de natures diverses : de simples polymères adsorbés ou des complexes biologiques de type sandwich anticorps-antigène-anticorps. Nous présentons dans ce paragraphe le cas d'un polymère adsorbé¹, le poly(acide acrylique) (PAA) ($M_w = 250\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Les filaments sont obtenus en combinant les propriétés d'auto-organisation des particules magnétiques sous champ et le contrôle, par le champ magnétique, de la formation d'un lien entre les particules.

Pour ce faire, des particules calibrées sont dispersées dans une solution aqueuse contenant du PAA. Ce dernier s'adsorbe sur les particules et crée une force répulsive à longue distances ($d > R_g$, où R_g , rayon de giration du polymère) qui varie comme $\exp(-d/R_g)$ [Mondain-Monval et al., 1998]. Ainsi, en l'absence de champ magnétique, les particules recouvertes de PAA ne s'agregent pas. Sous champ magnétique, le moment magnétique, induit dans chaque particule, conduit à l'organisation des particules sous forme de chaînes. Pour un champ magnétique suffisamment fort (de l'ordre de 25 mT), les particules s'agregent de façon irréversible : les chaînes persistent en l'absence de champ. Le processus de collage par le PAA intervient quand le champ magnétique approche les particules suffisamment les unes des autres ($d < R_g$) [Philip et al., 1997]. Le collage est donc *magnétiquement induit*. La force seuil nécessaire pour approcher les particules de façon à déclencher le processus de collage est de l'ordre d'une dizaine de pN. Pour une telle valeur, les particules

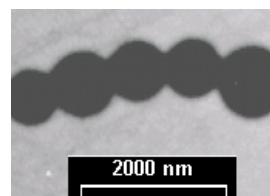


FIG. 3.2 – Chaîne magnétique irréversible obtenue avec du PAA (Emulsion V2G, ADEMTECH, diamètre $0.75\ \mu\text{m}$). Cliché TEM M. Gabyard.

¹L'exemple du sandwich anticorps-antigène-anticorps sera présenté au paragraphe 3.5.

sont parfaitement alignées dans la direction du champ à cause des interactions dipolaires ($\lambda \gg 1$).

Les filaments ainsi obtenus sont des chapelets de particules magnétiques parfaitement alignées, d'une particule d'épaisseur et collées par le PAA (Fig.3.2). Une fois le champ annulé, les filaments ne sont pas strictement alignés dans la direction du champ magnétique qui a permis leur fabrication mais fluctuent légèrement sous l'effet de l'agitation thermique.

3.2 Filaments flexibles

La flexibilité de ces filaments est illustrée sur la Fig.3.3 : les filaments sont fabriqués directement dans la cellule d'observation sur le microscope par application d'un champ magnétique perpendiculaire au plan d'observation. Une fois le champ annulé, les chaînes tombent et plient sous leur propre poids.

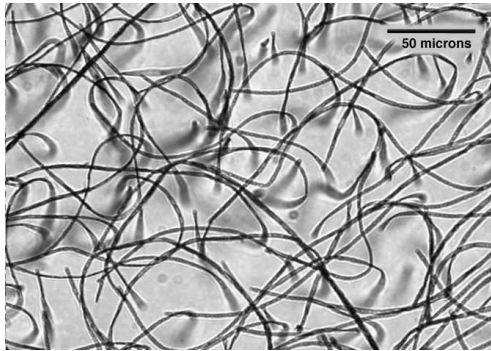


FIG. 3.3 – Flexibilité des filaments : de longs filaments calibrés ($200\ \mu\text{m}$ de long) sont fabriqués avec du PAA dans une cellule de $200\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. Ils plient sous leur propre poids quand le champ magnétique est arrêté.

3.3 Métastabilité sous champ magnétique

On s'attend à ce que les chaînes s'alignent dans la direction d'un champ appliqué afin de minimiser leur énergie magnétique. Toutefois, lorsque la direction du champ magnétique est changée “brusquement”, on obtient des formes métastables qui dépendent de la longueur L des filaments (Fig.3.4) :

- les plus courts ($L < 20\ \mu\text{m}$) pivotent dans la direction du champ
- les longs ($L > 30\ \mu\text{m}$) se plient en forme d'épingle à cheveux
- les plus longs ($L > 70\ \mu\text{m}$) forment des épingles multiples.

Les valeurs des longueurs, indiquées entre parenthèses, correspondent aux conditions de la Fig.3.4. Expérimentalement, on constate qu'il existe une longueur critique L_C du filament au-delà de laquelle l'instabilité apparaît. L'interprétation de L_C sera discutée au chapitre II.4.3. En l'absence de friction visqueuse, tous les filaments pivoteraient entièrement dans la direction du champ.

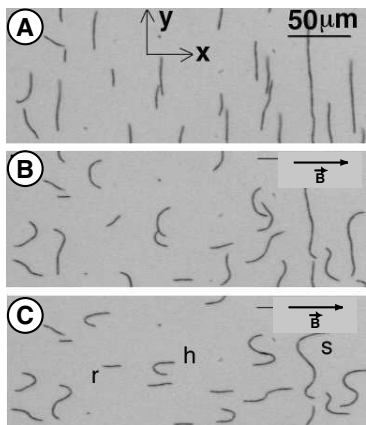


FIG. 3.4 – Configuration des filaments de différentes longueurs sous champ magnétique. Les filaments sont obtenus avec du PAA dans un tube eppendorf puis transférés dans la cellule d’observation. A : les filaments sédimentent au fond de la cellule puis sont alignées dans la direction y ; B : 2 s après l’application d’un champ tourné de 90° (selon la direction x) ; C : 10 s après la rotation du champ. les filaments les plus courts pivotent dans la direction du champ comme des bâtons rigides (r). Les longs filaments se plient en forme d’épingle à cheveux (h). Les plus longs forment des épingles multiples (s). L’intensité du champ appliqué est de 1.5 mT.

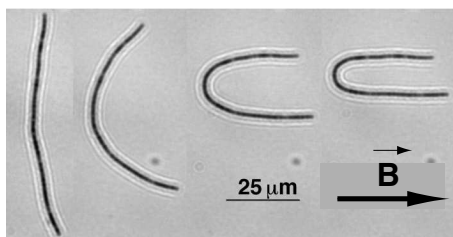


FIG. 3.5 – Filament soumis à un champ magnétique de plus en plus fort (de gauche à droite : 0.5 à 2 mT). Le filament est constitué de particules calibrées (Emulsion V2G, ADEMECH, diamètre $0.75 \mu\text{m}$) collées les unes aux autres par du PAA.

Ceci est d’autant plus visible quand le champ de forte intensité ($>1\text{mT}$) est appliqué “brusquement”. Si le champ appliqué est trop faible, les filaments pivotent lentement dans la direction du champ. Si quelques épingles se sont formées, elles vont petit à petit s’ouvrir grâce à l’agitation thermique.

Les formes en épingles (simples ou multiples) sont des configurations métastables : l’état de plus faible énergie correspond au cas où la chaîne est totalement alignée dans la direction du champ. Cette forme en épingle est le résultat d’une compétition entre deux effets antagonistes : (i) l’énergie magnétique tend à aligner les extrémités des chaînes dans la direction du champ et (ii) l’énergie élastique s’oppose à la déformation de la chaîne. Ainsi, plus le champ magnétique augmente et plus le rayon de courbure de l’épingle diminue (Fig.3.5). Rappelons que l’existence de ces formes en épingle à cheveux résulte de la friction visqueuse exercée par le milieu aqueux.

Lorsque le champ magnétique est annulé, les épingles se déplient, les filaments retournent à une forme allongée en quelques secondes (~ 5 s) ce qui traduit l’élasticité des chaînes. Les épingles s’ouvrent et se ferment réversiblement lorsque l’on opère des cycles de champ magnétique.

3.4 Méthodes expérimentales

Montage

Les filaments sont observés directement en transmission à l'aide d'un microscope droit Zeiss avec un objectif $\times 10$, $\times 40$ ou $\times 100$. On enregistre les images via une caméra CCD (780×512 pixels) reliée à un ordinateur (logiciel NIH image). Quatre bobines sont disposées en croix sur le microscope perpendiculairement à l'axe optique (Fig.3.6). Ce montage a été réalisé par Patrice Jenffer (Laboratoire PMMH, ESPCI, Paris). Les caractéristiques concernant les bobines sont détaillées en Annexe 7.

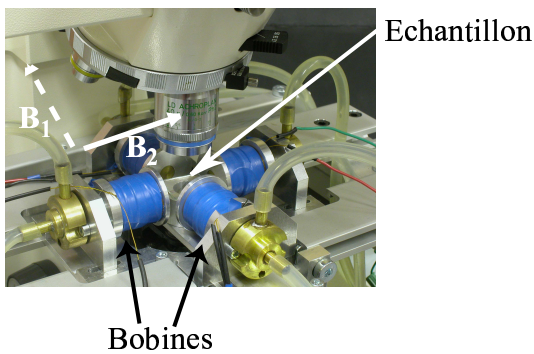


FIG. 3.6 – Quatre bobines sont disposées en croix sur un microscope. On peut ainsi appliquer un champ selon deux directions perpendiculaires (perpendiculairement à l'axe optique). Montage P. Jenffer (Laboratoire PMMH, ESPCI, Paris).

Description de l'expérience

Les particules magnétiques nous ont été fournies par la société ADEMTECH (Emulsion V2G, ADEMTECH). Elles ont été formées à partir d'une émulsion calibrée de ferrofluide (grains d'oxyde de fer dispersés dans de l'octane). Elles ont subi un traitement thermique afin d'évaporer l'octane. Le diamètre des particules ainsi obtenues est de $0.75 \mu\text{m}$.

Ces particules sont lavées cinq fois dans une solution de NP10 0.1% en masse. Elles sont ensuite dispersées dans un tube eppendorf, à une fraction volumique de 0.1%, dans une solution aqueuse contenant 0.1% en masse de PAA et 0.1% en masse de NP10. Le tube eppendorf est placé au centre d'une bobine pendant 5 minutes à 25 mT. Dans ces conditions d'expériences, la longueur des chaînes est comprise entre 50 et $100 \mu\text{m}$. Les bobines installées sur le microscope ne permettent pas d'obtenir un champ magnétique suffisant pour obtenir des chaînes irréversibles ($> 15 \text{ mT}$). Elles sont donc élaborées à l'aide d'une bobine annexe. Les chaînes sont ensuite transférées entre lame/lamelle à l'aide d'une micropipette. On a pris soin de vérifier que ce transfert ne détériorait pas les chaînes.

Les filaments obtenus avec des liens biologiques sont fragiles. Pour être sûr de ne pas les cisailer, il est préférable de les fabriquer directement dans la cellule d'observation. On utilise alors des capillaires de section carrée $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$.

On laisse l'émulsion sédimenter afin d'avoir toutes les particules dans le même plan. On pose le capillaire sur une lamelle de microscope et on le scelle avec une colle qui réticule sous UV (Epotecny, ref 4M21) en s'étant assuré de protéger l'intérieur du capillaire des rayons UV. Le tout est placé perpendiculairement à un champ magnétique de 25 mT pendant 5 min. On transfère ensuite la lamelle + capillaire sur le microscope du montage. La fraction volumique des particules et la taille du capillaire ont été optimisées pour que les chaînes n'interagissent pas entre elles. Si les filaments sont trop rapprochés, on obtient alors l'image Fig.3.7 sur laquelle on ne peut faire de traitement d'image.

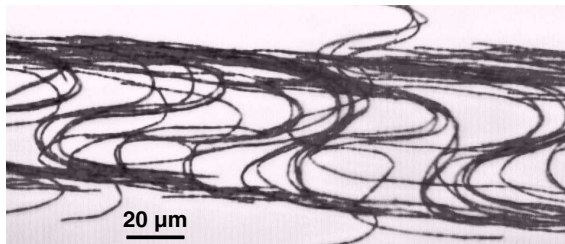


FIG. 3.7 – Filaments fabriqués directement dans la cellule d'observation (un capillaire de section carrée) Les filaments sont trop proches ce qui conduit à la formation d'épingles imbriquées les unes dans les autres.

Une fois introduites dans la cellule d'observation, on laisse les chaînes sédimenter ce qui facilite leur observation (elles restent bien dans le plan focal). On applique alors un champ magnétique (~ 0.5 mT) afin d'aligner complètement les filaments. Ils sont ensuite soumis à un champ magnétique appliqué à 90° du précédent. Suivant leur longueur, les filaments adoptent trois types de configurations : les petits pivotent et s'alignent totalement dans la direction du champ, les moyens se plient en forme d'épingle à cheveux et les plus grands forment des épingles multiples.

On sélectionne, dans notre champ d'observation, une épingle isolée ne présentant pas de défauts. On retient une épingle d'une particule d'épaisseur, non attachée au verre. L'épingle ne doit pas présenter de points anguleux synonymes de cassure du lien. On fait alors varier l'intensité du champ magnétique de 2.5 mT à 0.5 mT. On enregistre l'image de l'épingle pour chaque valeur du champ appliqué. Ces images seront ensuite traitées (voir paragraphe suivant) pour obtenir le rayon de courbure de l'épingle en fonction de la valeur du champ.

On vérifie que le filament sélectionné a bien un comportement élastique : (i) en coupant le champ et en observant le filament revenir à une forme allongée et (ii) en s'assurant que son comportement sous champ est reproductible. On effectue ce travail sur plusieurs épingles. Après traitement des images pour obtenir la courbure, on reporte la moyenne des courbures en fonction du champ magnétique.

Traitement des images

Les images acquises sont d'abord seuillées afin d'obtenir une image binaire, ce qui nécessite d'avoir des images bien contrastées. P. Jop et M. Fermigier ont

conçu un programme qui opère de façon itérative afin de réduire la largeur des filaments à 1 pixel (*squelettisation*). Les coordonnées des pixels sont analysées et la courbe régulière est ajustée par des splines cubiques [Dierckx, 1993] afin d'extraire la courbure de la chaîne en fonction de l'abscisse curviligne. Lors de cette dernière étape, un paramètre de *lissage* doit être spécifié. Il définit le degré d'égalisation des irrégularités. Ce choix s'est effectué en comparant les résultats du traitement d'épingles de rayon constant.

3.4.1 Description théorique

On va dans un premier temps décrire l'élasticité d'une chaîne et déterminer la dépendance du rayon de courbure de la chaîne avec le champ magnétique. On montrera ensuite que la connaissance du rayon de courbure de la chaîne permet de remonter à l'élasticité du lien.

3.4.1.a Elasticité d'une chaîne

L'énergie totale de l'épingle est la somme d'un terme élastique dû à la courbure et d'un terme d'énergie magnétique.

L'énergie élastique est assimilée à celle d'une poutre en flexion, caractérisée par le module d'Young du matériau E et son moment d'inertie I . L'énergie élastique est donnée par :

$$U_{el} = EI \int_0^L \frac{ds}{R^2(s)} \quad (3.1)$$

où s est l'abscisse curviligne, $R(s)$ le rayon de courbure local et L la longueur de la poutre (Fig.3.8). Si θ est l'angle entre la direction locale de la chaîne et une direction de référence, l'énergie élastique s'écrit aussi :

$$U_{el} = EI \int_0^L \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds \quad (3.2)$$

L'énergie magnétique est la somme des énergies d'interaction magnétique entre les particules qui composent la chaîne (en ne considérant que les interactions entre plus proches voisins), soit :

$$U_{mag} = \frac{1}{4\pi\mu_0} \sum_1^{N-1} \frac{m^2}{(2a)^3} (1 - 3\cos^2 \alpha) \quad (3.3)$$

où N est le nombre de particules dans la chaîne, m le moment dipolaire magnétique de chaque particule, a le rayon d'une particule et α l'angle entre le champ magnétique local et la direction de la chaîne.

En passant à une description continue de la chaîne (dans la limite $N \gg 1$), l'énergie magnétique devient :

$$U_{mag} = \frac{1}{4\pi\mu_0} \int_0^L \frac{m^2}{8a^3} (1 - 3 \cos^2 \alpha) \frac{ds}{2a} \quad (3.4)$$

Le moment magnétique de chaque particule est :

$$m = \frac{4}{3} \pi a^3 \mu_0 \chi H \quad (3.5)$$

où χ est la susceptibilité magnétique effective des particules (en tenant compte de la forme sphérique).

L'énergie totale est donc :

$$U = \int_0^L \left[EI \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2 + \frac{4\pi\mu_0}{72} a^3 \chi^2 H^2 \frac{(1 - 3 \cos^2 \alpha)}{2a} \right] ds \quad (3.6)$$

On définit : une abscisse curviligne adimensionnelle s' telle que $s = 2as'$; la longueur de persistance de la chaîne λ_p telle que : $EI = \lambda_p k_B T$, et un paramètre b_H comme le rapport entre l'énergie d'interaction d'une paire de particules alignées dans le champ et l'énergie thermique $k_B T$, tel que :

$$\frac{8\pi\mu_0}{72} a^3 \chi^2 H^2 = b_H k_B T$$

On obtient alors :

$$U = k_B T \int_0^N \left[\frac{\lambda_p}{2a} \left(\frac{d\theta}{ds'} \right)^2 + \frac{b_H}{2} (1 - 3 \cos^2 \alpha) \right] ds' \quad (3.7)$$

Avec les notations de la Fig.3.8.B. , l'énergie totale de la chaîne est de la forme :

$$U \propto \int_0^N [\theta'^2 + c_H f(\theta)] ds' = \int F(\theta', \theta) ds' \quad (3.8)$$

où $\theta' = d\theta/ds'$, et $c_H = ab_H/\lambda_p$. La forme d'équilibre de la chaîne $\theta(s')$ est donnée par la minimisation de l'énergie totale, en tenant compte de la conservation du nombre de particules et des conditions aux limites. Compte tenu de la symétrie des épingles, on peut considérer seulement la moitié d'une épingle. A l'extrémité libre, la courbure de la chaîne doit être nulle pour assurer l'équilibre mécanique. Au milieu de l'épingle ($s'=0$), l'orientation est fixée ($\theta=\pi/2$). Les conditions aux limites sont donc :

$$d\theta/ds' = 0 \text{ en } s' = N$$

$$\theta = \pi/2 \text{ en } s' = 0$$

En utilisant une méthode de calcul variationnel [Riley et al., 1997], si l'énergie donnée par l'équation 3.8 est minimale, alors la fonction F obéit à l'équation différentielle :

$$F - \theta' \frac{\partial F}{\partial \theta'} = C^{te} \quad (3.9)$$

soit :

$$\theta'^2 - c_H f(\theta) = C_0 \quad (3.10)$$

Si on ne tient pas compte de la réfraction des lignes de champ par le matériau magnétique, l'angle α est confondu avec l'angle θ et $f(\theta) = 1 - 3 \cos^2 \theta$. L'équation différentielle qui définit la forme de la chaîne est alors :

$$\theta'^2 - c_H (1 - 3 \cos^2 \theta) = C_0 \quad (3.11)$$

Dans le plan de symétrie de la chaîne ($\theta = \pi/2$), la courbure de la chaîne est donnée par : $\theta' = \sqrt{C_0 + c_H}$.

La valeur de la constante C_0 est fixée par la condition sur l'extrémité libre de la chaîne. Lorsque la chaîne est très longue (devant le rayon de courbure dans le plan de symétrie), les extrémités libres de la chaîne sont parallèles au champ magnétique ($\theta = 0$) et $\theta' = 0$ lorsque $\theta = 0$. Ceci conduit alors à $C_0 = 2c_H$ et à une équation différentielle simplifiée :

$$\theta' = -\sqrt{3c_H} \sin \theta \quad (3.12)$$

Pour cette forme simplifiée, la courbure maximale de la chaîne (en $s' = 0$, correspondant à $\theta = \pi/2$) est $\sqrt{3c_H}$, soit :

$$R_{min} = \frac{1}{\chi H} \sqrt{\frac{3EI}{\pi \mu_0 a^4}} \quad (3.13)$$

Dans cette approximation, le **rayon de courbure** adimensionné minimal de la chaîne doit être **inversement proportionnel au champ magnétique**.

Notons qu'il est également possible d'intégrer numériquement l'équation 3.11 [Jop, 2002].

3.4.1.b Elasticité du lien

La grandeur qui nous intéresse est la rigidité de flexion du lien. Nous allons décrire comment il peut être déduit du rayon de courbure de l'épingle.

On note κ la rigidité de flexion d'un lien, de longueur l , tel que (Fig.3.10) :

$$E_{el-lien} = \frac{\kappa l}{R_p^2} \quad (3.14)$$

Les particules étant supposées rigides, la **déformation du filament est seule-**

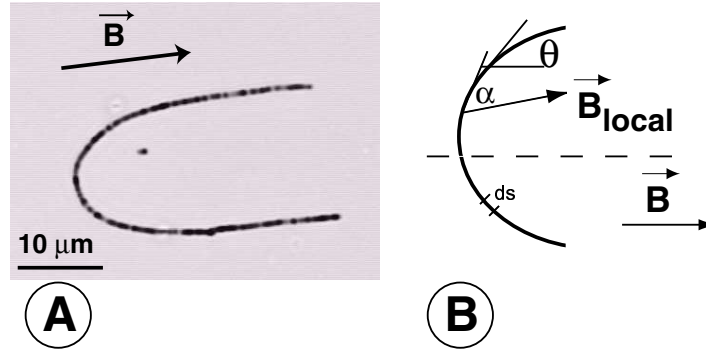


FIG. 3.8 – A : filament magnétique sous champ formant une épingle B : Représentation du système de coordonnées pour la description de l'épingle.

ment localisée dans les liens. Ainsi l'énergie élastique du filament (module de flexion noté EI) est la même que celle de ce même filament pour lequel on aurait enlevé les particules (rigidité de flexion noté κ) (Fig.3.9.A).

Si on considère deux particules de la chaîne reliées par un lien schématisé par un tube de longueur l (Fig.3.9B) on peut alors écrire :

$$U_{el} = \frac{\kappa l}{R_p^2} = \frac{EI(2a + l)}{R^2} \quad (3.15)$$

or, le rayon de courbure de l'épingle R est reliée au rayon de courbure du lien R_p par la relation (Fig.3.10) :

$$\alpha \simeq \frac{l/2}{R_p} \text{ et } \alpha \simeq \frac{a + l/2}{R} \simeq \frac{a}{R} \quad (3.16)$$

(On assimile le lien à un segment droit.)

$$R_p = R(l/2a) \quad (3.17)$$

La rigidité du lien et celle de la chaîne sont donc reliées par la relation suivante :

$$\kappa = \frac{l}{2a} EI \quad (3.18)$$

En observant macroscopiquement la chaîne, on peut ainsi remonter aux propriétés mécaniques d'un lien submicronique.

Si on reporte 3.18 dans l'équation 3.13, on obtient la courbure maximale (sans dimension *i.e.* $C_{max} = 2a/R$) de l'épingle :

$$\boxed{C_{max} = \chi H \sqrt{\frac{\pi \mu_0 a^3 l}{6 \kappa}}} \quad (3.19)$$

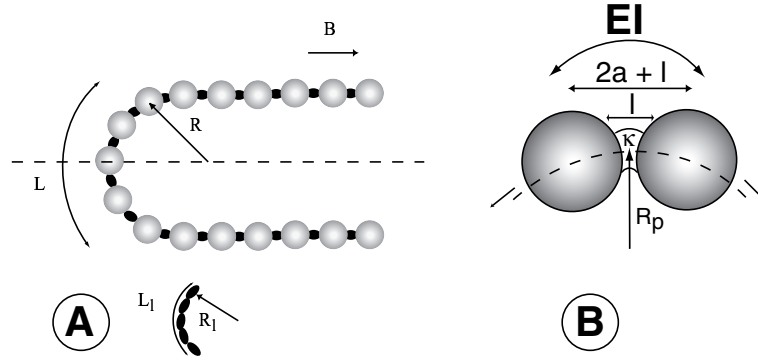


FIG. 3.9 – A : Epingle schématisée : les sphères représentent les particules magnétiques et les parties noires, les liens. Les paramètres de l'épingle sont R , le rayon de courbure L , la longueur du filament impliquée dans la courbure et EI , la rigidité de flexion. Si on "enlève" les particules, on obtient le matériau (en encart) ayant une longueur L_l , un rayon de courbure R_l et une rigidité de flexion κ . Les particules étant supposées rigides, la déformation du filament est seulement localisée dans ses liens. Ainsi l'énergie élastique du filament est la même que celle de ce même filament pour lequel on aurait enlevé les particules. On peut ainsi écrire $E_{el} = \frac{\kappa L_l}{R_l^2} = \frac{EIL}{R^2}$. B : Si on considère deux particules de la chaîne reliées par un lien schématisé par un tube de longueur l et de rayon de courbure R_p , on peut alors écrire $U_{el} = \frac{\kappa l}{R_p^2} = \frac{EI(2a + l)}{R^2}$.

3.4.1.c Longueur critique L_C

Considérons un filament orienté dans la direction du champ magnétique. Lorsque que la direction du champ tourne brusquement de 90° , selon sa longueur (i) soit le filament pivote et s'aligne dans la nouvelle direction du champ (ii) soit il se déforme sous forme d'épingles (Fig.3.11). Afin de déterminer la longueur critique L_c du filament pour laquelle l'instabilité apparaît, on effectue un calcul de stabilité linéaire. Considérons une petite perturbation de la forme $y = \beta \sin qx$. Avec les notations définies Fig.3.11, on a : $\sin \theta \simeq q\epsilon \cos qx$ et $\frac{d\theta}{ds} \simeq -q^2 \sin qx$ ². L'équation 3.6 devient :

$$U = \int_{-L/2}^{L/2} \left[EI \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2 + \frac{4\pi\mu_0}{72} a^3 \chi^2 H^2 \frac{(1 - 3 \sin^2 \theta)}{2a} \right] dx \quad (3.20)$$

²Soit $\vec{OM} = x\vec{i} + y\vec{j}$. $\vec{t}$ est défini par $\vec{t} = \frac{d\vec{OM}}{ds}$. On a alors $ds^2 = dx^2 + dy^2 = dx^2(1 + dy^2/dx^2) \simeq dx^2$ et $\vec{t} \cdot \vec{j} = \cos \theta = \frac{dy}{ds}$

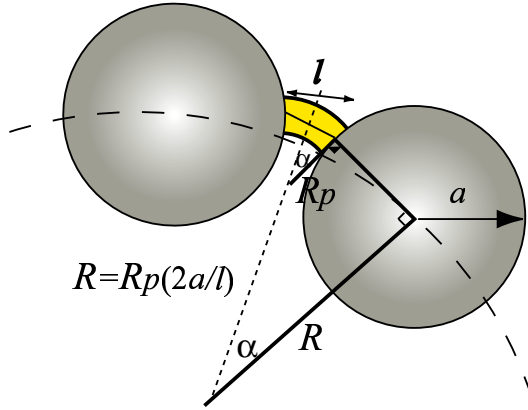


FIG. 3.10 – Relation entre le rayon de courbure de l'épingle R et celui du lien R_p .

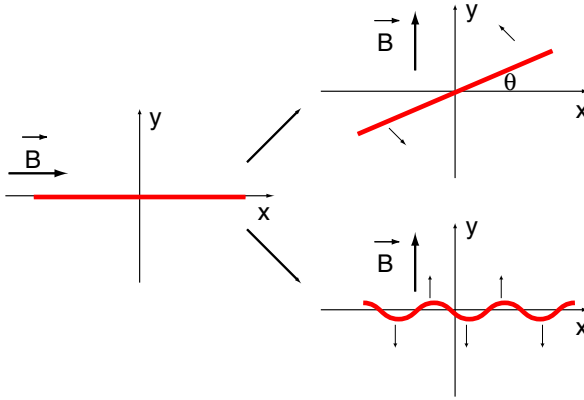


FIG. 3.11 – Différentes évolutions possibles pour un filament initialement rectiligne et parallèle à l'axe x . Soit la configuration de la perturbation a une énergie trop élevée et dans ce cas, le filament ne peut que tourner en bloc (figure du haut). Soit l'énergie de la configuration pliée est plus basse alors le filament forme des épingles (figure du bas).

soit

$$U = k_B T \int_{-L/2}^{L/2} q^4 \varepsilon^2 \sin(qx) + \frac{b_H}{4a} (1 - 2q^2 \varepsilon^2 \cos^2(qx)) dx \quad (3.21)$$

A cause des conditions aux limites, le vecteur d'onde q doit être discret ($q = n\pi\lambda_p/L$). Si on introduit les variables adimensionnelles $q' = q\lambda_p$, $\epsilon' = \epsilon/\lambda_p$ et $x' = x/2a$ alors la différence d'énergie avec la chaîne sans perturbation ($\epsilon = 0$) s'écrit :

$$U - U_0 = \frac{2ak_B T \varepsilon'^2 q'^2}{\lambda_p} \int_{-N/2}^{N/2} q'^2 - \left(q'^2 + \frac{3\lambda_p b_H}{4a} \right) \cos^2(2aq'x/\lambda_p) dx \quad (3.22)$$

En intégrant l'expression précédente, on trouve :

$$U - U_0 = \frac{Nak_B T \varepsilon'^2 q'^2}{\lambda_p} \left(q'^2 - \frac{3\lambda_p b_H}{4a} \right) \quad (3.23)$$

Il existe donc un vecteur d'onde critique :

$$q'_c = \sqrt{\frac{3b_H \lambda_p}{4a}} \quad (3.24)$$

Ce qui correspond à une longueur critique :

$$L_c = \sqrt{\frac{12\pi EI}{\mu_0 \chi^2 H^2 a^2}} \quad (3.25)$$

Si $q' < q'_c$ alors $U < U_0$: le filament se plie sous forme d'épingle.

On peut alors prévoir le comportement du filament en fonction de sa longueur L :

si $L < L_c$, le filament tourne en bloc,

si $L > L_c$ le filament forme des épingles.

3.4.2 Résultats et discussion

La Fig.3.12.A montre un filament à différents champs magnétiques. Après traitement numérique des images (Fig.3.12.B.), le programme mesure la courbure maximale des épingles. On effectue ce travail sur une dizaine d'épingles et on reporte la moyenne des courbures en fonction du champ magnétique (Fig.3.13). On vérifie que le comportement des chaînes sous champ demeure inchangé le temps de l'expérience (quelques minutes à une heure après leur fabrication).

La courbure d'une épingle, ayant subit différents cycles de champ magnétique (rampe d'intensités croissantes puis décroissantes), est reproductible. A champ nul, la chaîne revient à une courbure nulle. Ceci montre que le comportement est élastique. L'équation 7 montre que la courbure de l'épingle doit être pro-

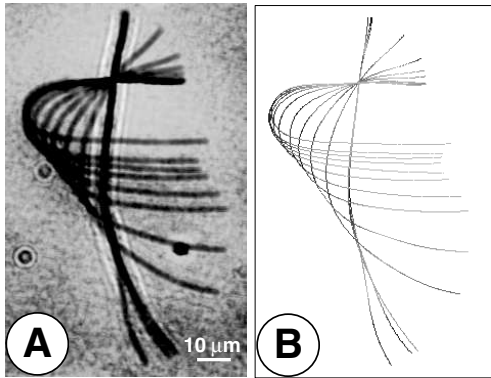


FIG. 3.12 – A : Evolution de la forme d'une épingle en fonction du champ ($200 \text{ A.m}^{-1} < H < 1800 \text{ A.m}^{-1}$). Superposition des images brutes, B : après les différentes étapes du traitement d'image (seuillage, squelettisation, lissage)

portionnelle au champ magnétique. Si l'on reporte la moyenne des courbures de différentes épingles en fonction du champ magnétique (Fig.3.13.A), on observe que les points sont alignés sur une même droite. Ceci valide donc notre modèle. On va ainsi pouvoir l'utiliser pour accéder au module élastique, κ , du lien.

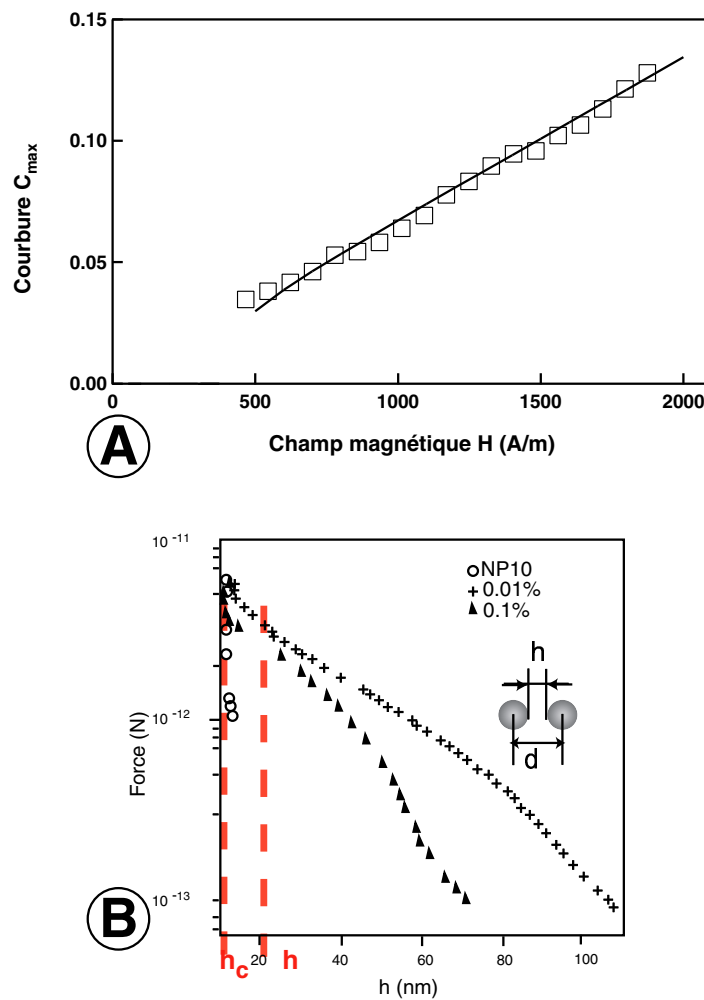


FIG. 3.13 – A : Courbure maximale adimensionnée ($2a/R$) de l'épingle en fonction du champ magnétique. Emulsion V2G (Ademtech) diamètre $0.75 \mu\text{m}$, PAA ($M_W=250\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) 0.1% en masse, NP10 0.1% en masse. $\square$: résultats expérimentaux ; - : résultats théoriques. B : Profil force/distance pour une solution de PAA à deux concentrations (à pH 4) : $\times$ 0.01% en masse, $\blacktriangle$ 0.1% en masse, $\circ$ NP10. La courbe correspondant à PAA 0.1% en masse présente un saut correspondant à la formation de liens irréversibles. h_c est la distance d'approche minimale. h est la distance à laquelle les chaînes deviennent irréversibles. Extrait de [Philip et al., 1997]

D'après l'équation 7, la pente de la droite, ainsi obtenue, est proportionnelle à κ/l . Pour avoir accès au module élastique du lien, κ , il faut connaître la longueur l du lien.

Pour mesurer l , on utilise la *Magnetic Chaining Technique*. Cette technique détermine la distance entre particules par diffraction de la lumière par des chaînes de particules magnétiques orientées sous champ (voir paragraphe I.1.3). Connaissant la force magnétique appliquée, on peut alors directement tracer le profil force/distance [Leal-Calderon et al., 1994].

On mesure tout d'abord le profil d'interactions entre des particules nues pour obtenir h_c , la distance d'approche minimale (correspondant au contact des sphères dures). On répète cette mesure en présence du lien (PAA) et on détermine la distance h à laquelle les chaînes deviennent irréversibles. La différence $h - h_c$ correspond à la longueur l du lien.

Pour le PAA, $M_W=250\,000\text{ g.mol}^{-1}$, on trouve

$$l=10\text{ nm}$$

Si on ajuste la courbe, représentant la variation de la courbure en fonction du champ magnétique, par une droite, on trouve que le rapport C_{max}/H est égal à $6.67\,10^{-5}$. On en déduit que pour le PAA $M_W=250\,000\text{ g.mol}^{-1}$, le module de flexion est :

$$\kappa = 7.8\,10^{-26}\text{ J.m} \quad (\kappa/l=7.8\,10^{-18}\text{ J} \approx 2000\,k_B T)$$

Description de la colle : les résultats précédents peuvent nous éclairer sur l'origine de l'élasticité des filaments. En effet, la valeur élevée de l'énergie élastique, par rapport à $k_B T$ suggère que le polymère s'attache en plusieurs points entre les particules.

Un polymère, de même longueur, attaché seulement par ses extrémités, aurait une élasticité en flexion négligeable tant que sa forme d'équilibre (soit la pelote de rayon de giration R_g) n'est pas modifiée.

La conformation d'une chaîne de polymère adsorbé sur une paroi résulte de deux effets antagonistes (i) un abaissement de l'énergie libre de l'ordre de $k_B T$ par site d'absorption. La nature des interactions polymère/surface peut être électrostatique, liaisons hydrogènes, etc., (ii) une augmentation de l'énergie libre due à une perte d'entropie conformationnelle. La proximité de la surface diminue le nombre de conformations accessibles. [Semenov and Joanny, 1995] ont montré qu'en bon solvant, un polymère s'adsorbe en faisant des "boucles, trains, queues" (Fig.56). Dans nos expériences, le PAA est en bon solvant dans l'eau ($\theta = 20^\circ\text{C}$), il est pratiquement neutre ($\text{pH}=3.4$). Ainsi l'hypothèse selon laquelle l'adsorption du PAA se fait en plusieurs points sur deux particules adjacentes est en accord avec la description des polymères adsorbés sur des surfaces .

Afin de comprendre l'origine de la flexibilité de cette colle, nous devons attribuer des dimensions physiques au lien. Nous considérons alors un tube de rayon y

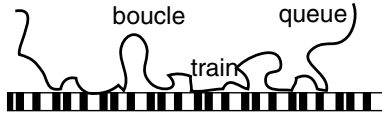


FIG. 3.14 – Conformation d'un polymère adsorbé sur une surface en bon solvant.

et de longueur R_g . En effet l'épaisseur d'une couche de polymères adsorbés est de l'ordre de R_g (Fig.3.15.A.). La longueur de l'axe du tube, c'est-à-dire la distance entre les particules, est notée l .

y , a , l et R_g sont reliés géométriquement par la relation :

$$a^2 = y^2 + \left(a - \frac{R_g - l}{2}\right)^2 \quad (3.26)$$

soit

$$y^2 = a(R_g - l) \quad (3.27)$$

E étant le module d'Young de la colle, la rigidité de flexion s'écrit

$$EI = \frac{E\pi y^4}{4} = \kappa \quad (3.28)$$

Dans notre cas, on trouve $y=97$ nm ce qui donne un module d'Young $E=1.10^3$ Pa.

Pour un gel de polymère, le module d'Young s'écrit $E \simeq k_B T / \xi^3$, ξ étant la distance moyenne entre les points de réticulation du gel. Si on compare avec la valeur du module d'Young trouvée précédemment, on obtient $\xi = 15$ nm, ce qui est de l'ordre de grandeur de la longueur du lien l . L'immobilisation, par adsorption, des segments du polymère sur les particules (Fig.3.15.B.) conditionne l'élasticité de la colle : la distance moyenne entre ces points d'adsorption correspond à la distance moyenne des points de réticulation d'un gel macroscopique.

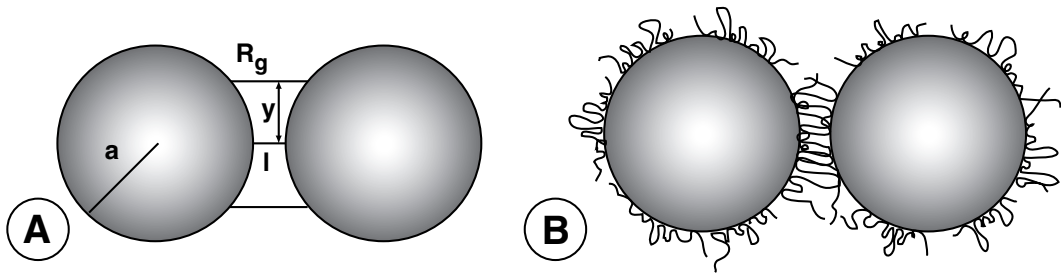


FIG. 3.15 – A : La colle est assimilée à un tube de longueur R_g et de rayon y . l est la longueur de l'axe du tube c'est-à-dire la distance entre les particules.

[Biswal and Gast, 2001] ont fabriqué des filaments flexibles et ont mesuré leur module élastique par analyse des fluctuations thermiques d'une part, et utilisation

de pinces optiques, d'autre part. Ils trouvent ainsi un module de flexion de 10^{-21} J.m (pour des filaments obtenus avec du PEG $M_W=733$ g.mol $^{-1}$) 10^{-23} J.m (pour des filaments obtenus avec du PEG $M_W=3400$ g.mol $^{-1}$) [Biswal and Gast, 2003]. Ces valeurs élevées proviennent du mode de préparation des filaments. Ils sont constitués de particules fonctionnalisées avec de la streptavidine et reliées par un PEG-bis biotine ($M_W=3400$ g.mol $^{-1}$ ou $M_W=733$ g.mol $^{-1}$). Le lien utilisé est extrêmement petit comparé au PAA ($M_W=250\,000$ g.mol $^{-1}$) que nous avons utilisé. Ceci explique la rigidité des ces filaments. De plus, le lien est introduit une fois les particules organisées sous forme de chaînes. Afin d'obtenir un lien unique par cette méthode, il faudrait contrôler le taux de couverture en streptavine sur les particules. De plus, il leur est plus difficile, voire impossible, de caractériser, a posteriori, le nombre de liens entre les particules (Fig.3.16).

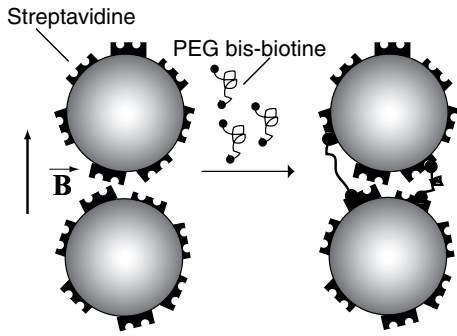


FIG. 3.16 – Fabrication de filaments magnétiques selon [Biswal and Gast, 2001]. Les liens sont introduits une fois les particules organisées sous forme de chaînes.

Vieillessement de la colle : on observe qu'avec le temps les chaînes deviennent de plus en plus rigides. Au-delà de 48h, le champ magnétique du montage n'est plus suffisant pour former des épingles.

Ceci vient du fait que le polymère continue de s'adorber de plus en plus (voir paragraphe 2.2.4).

Régime de flexion : il convient de vérifier que nous ne sommes pas en train de tirer sur le lien mais que nous le sollicitons simplement en flexion.

Tant que les particules ne sont pas en contact, la colle est seulement sollicitée en flexion. Quand les particules arrivent en contact, la colle est sollicitée en traction par un effet de levier. Ainsi, la limite entre le régime de flexion et celui de traction correspond au contact des particules entre elles. Quand les particules sont en contact la distance d , définie sur la Fig.3.17, est nulle. On détermine d géométriquement de la façon suivante :

$$\frac{l}{2} = a(1 - \cos \theta) \text{ et } \frac{a}{R} = \sin \theta \quad (3.29)$$

d'où

$$\frac{l}{2a} = 1 - \sqrt{1 - \left(\frac{a}{R}\right)^2} \text{ soit } \left(1 - \frac{l}{2a}\right)^2 = 1 - \left(\frac{a}{R}\right)^2 \quad (3.30)$$

C, courbure adimensionnée, est définie par $C = 2a/R$, d'où :

$$1 - \frac{C^2}{4} = (1 - l/2a)^2 \quad (3.31)$$

Avec les particules utilisées ($2a = 750$ nm), la courbure limite est $C=0.32$. La courbure maximale explorée expérimentalement avec le lien PAA est de 0.13 ce qui prouve bien que les mesures sont effectuées dans le régime de flexion. Un autre argument consiste à remarquer qu'il n'y a pas d'accident dans la courbe, elle varie continuellement sans saut ni changement de pente.

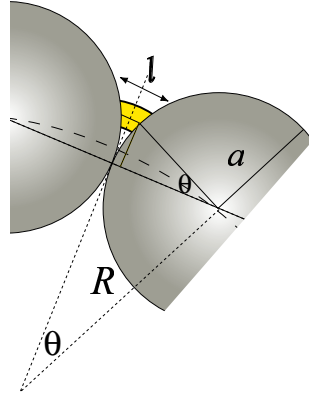


FIG. 3.17 – A partir du moment où les particules sont en contact, la colle est sollicitée en traction. La limite entre les deux régimes correspond au contact des billes. La courbure limite est donnée par $1 - \frac{C^2}{4} = (1 - l/2a)^2$.

Longueur critique L_c : nous avons maintenant toutes les données pour déterminer L_c : $EI = 2a\kappa/l = 0.75.8 \cdot 10^{-26}/1 \cdot 10^{-2} = 5.85 \cdot 10^{-24} \text{ J.m}$, $a = 0.375 \mu\text{m}$, $\chi = 1$, $\mu_0 = 1.26 \cdot 10^{-6} \text{ H/m}$ et $H = 1.38 \cdot 10^3 \text{ H}$.

On obtient alors

$$L_c = \sqrt{\frac{12\pi EI}{\mu_0 \chi^2 H^2 a^2}} = 25.6 \mu\text{m}$$

La Fig.3.18 représente des filaments de différentes longueurs obtenus avec du PAA (Fig.3.18.A). Si on applique brusquement un champ magnétique ($H = 1.38 \cdot 10^3 \text{ A.m}^{-1}$) perpendiculairement à la direction des filaments (Fig.3.18.B), on observe qu'un seul filament se plie sous forme d'épingle. La longueur de ce filament est de $27 \mu\text{m}$ tandis que la longueur maximale des filaments qui pivotent en bloc est de $23 \mu\text{m}$. la longueur critique est donc comprise entre 23 et $27 \mu\text{m}$ ce qui est en accord avec la valeur calculée précédemment.

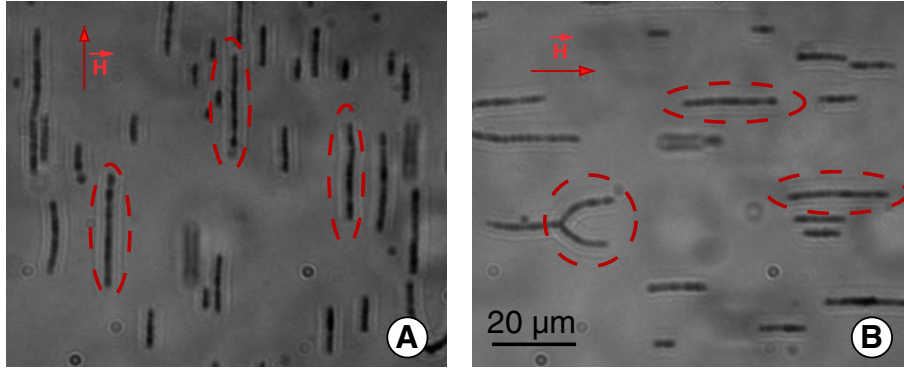


FIG. 3.18 – A : filaments de différentes longueurs obtenus avec du PAA ; B : lorsque que le champ bascule brusquement de 90° , les filaments pivotent en bloc dans la direction du champ sauf un filament qui se plie sous forme d'épingle. La longueur des filaments entourés est (de gauche à droite), $L = 27\mu m$, $L = 22\mu m$ et $L = 23\mu m$. On en déduit alors que : $23\mu m < L_c < 27\mu m$.

Un autre exemple de colle : il est également possible d'obtenir des chaînes irréversibles en remplaçant le PAA par du caséinate de sodium (voir paragraphe II.2.5). Les chaînes sont également élastiques et on observe la formation d'épingles sous champ (Fig.3.19). De la variation de la courbure maximale en

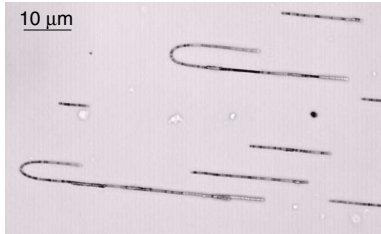


FIG. 3.19 – Chaînes magnétiques irréversibles obtenues avec du caséinate de sodium (Emulsion V2G, ADEMTECH, diamètre $0.75\mu m$). Cliché de microscopie pris en présence d'un champ magnétique.

fonction du champ magnétique (Fig.3.20), on déduit $\kappa/l = 1.95 \cdot 10^{-17}$ J. On note que la courbe obtenue (Fig.3.20) ne passe pas par l'origine : ceci peut être imputé au frottement des chaînes sur la surface de verre.

[Bressy, 2003] a déterminé que la longueur l du lien caséinate est

$$l = 8 \text{ nm}$$

On en déduit donc que

$$\kappa = 1.5 \cdot 10^{-25} \text{ J.m} \quad (\kappa/l = 1.95 \cdot 10^{-17} \text{ J} \approx 4800 k_B T)$$

On note que l'on est toujours dans le régime de flexion car la valeur maximale de la courbure est de 0.1, la valeur limite de la courbure étant de 0.32.

Il est clair, comme l'ont montré les expériences, que le collage est simplement dû à une adsorption multiple des chaînes sur les particules en vis-à-vis. L'élasticité de la colle dépend certainement de la façon dont l'entropie de la chaîne est modifiée par l'adsorption. Une protéine, qui s'absorbe par ces zones hydrophobes, doit conduire à un comportement différent d'un homopolymère tel que le PAA.

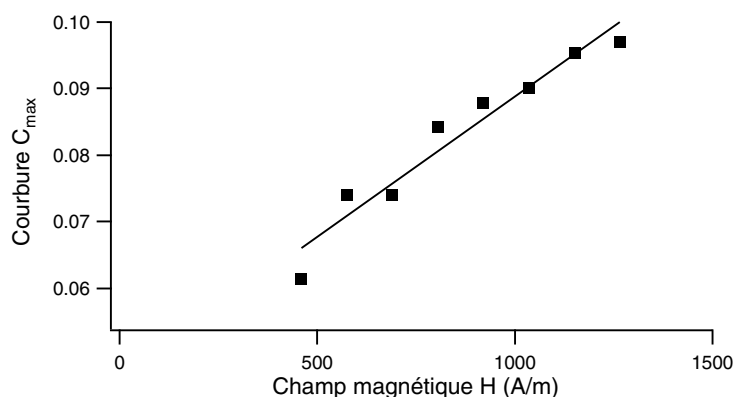


FIG. 3.20 – Courbure maximale adimensionnée ($2a/R$) de l'épingle en fonction du champ magnétique. Emulsion V2G (ADEMTECH) diamètre $0.75 \mu\text{m}$, Caséinates de sodium 0.1% en masse, NP10 0.1% en masse. ■ : résultats expérimentaux ; – : ajustement linéaire.

3.4.3 Conclusion

Nous avons réalisé de nouveaux matériaux : des filaments magnétiques flexibles constitués de particules superparamagnétiques calibrées et assemblées par des liens. Ces chaînes ont un comportement original dû à leurs propriétés élastiques et magnétiques. On observe alors une instabilité sous champ magnétique qui permet de courber les filaments en forme d'épingle.

Nous avons développé un modèle qui décrit cette forme d'équilibre liée aux propriétés magnétiques des filaments et à la déformation élastique des liens. Il prévoit que la courbure de l'épingle varie linéairement avec le champ magnétique. Nos expériences, réalisées avec un polymère, le PAA, sont en accord avec cette description. La pente de la droite, ainsi obtenue, est proportionnelle à κ/l (module de flexion du lien sur longueur du lien). La mesure de la longueur du lien, par diffraction de la lumière, permet alors d'accéder au module de flexion du lien.

Cette technique repose sur l'observation de filaments magnétiques au microscope. On a montré que l'on peut ainsi sonder la flexibilité d'objets extrêmement petits (submicroniques). Cette technique permet également d'étudier des liens très flexibles en adaptant la taille des particules. Nous avons choisi d'étudier l'élasticité des filaments par l'intermédiaire de leur réponse à un champ

magnétique plutôt que par l'analyse des fluctuations thermiques. En effet, les fluctuations thermiques observées au microscope sont de faible amplitude. Elles sont limitées par la taille des particules et le frottement des chaînes sur la surface. Ceci rend difficile l'étude de leurs propriétés mécaniques par ce biais. Néanmoins, l'étude des fluctuations conduit à des résultats en accord avec les nôtres [Jop, 2002].

Ainsi, cette instabilité sous champ magnétique permet d'utiliser les filaments comme un nouvel outil de caractérisation micromécanique : la mesure de la courbure, d'une part, et de la longueur du lien par diffraction de la lumière, d'autre part, donne accès très simplement à la rigidité de flexion du lien [Jop et al., 2003].

Afin d'étendre les possibilités de cette technique à des objets plus complexes comme les molécules biologiques, un sandwich anticorps-antigène-anticorps a été étudié. Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

3.5 Les filaments magnétiques flexibles comme capteurs micromécaniques

La micromécanique des objets biologiques, comme celle des protéines, est un point important pour comprendre les mécanismes du vivant [Bao, 2002]. Pour manipuler de si petits objets, il faut des techniques adaptées. Les pinces optiques et magnétiques, l'AFM et les micropipettes de verre ont ainsi permis d'explorer les modes d'étirement et de torsion de biopolymères tels que l'actine [Kishino and Yanagida, 1988], la titine [Kellermayer et al., 1997] et l'ADN [Cluzel et al., 1996]. La mesure de la flexibilité de filaments d'actine et celle des microtubules ont été effectuées par analyse des fluctuations thermiques [Gittes et al., 1993], [Isambert et al., 1995], par observation de la déformation induite par des forces hydrodynamiques [Wiggins et al., 1998] ou par des pinces optiques [Arai et al., 1999].

L'exploration du mode de flexion n'a jusqu'à présent concerné que des biopolymères. Les méthodes utilisées portent en effet sur des observations au microscope et interdisent donc l'étude d'objets submicroniques. Le module d'Young est alors déduit de la mesure de la longueur de persistance des biopolymères. Ce type de mesures est ainsi limité à des objets plus grands que leur longueur de persistance.

On a montré, dans le chapitre précédent, que les filaments magnétiques flexibles constituent un nouvel outil pour analyser le comportement en flexion des liens qui relient les particules magnétiques colloïdales entre elles. Ce sont les filaments magnétiques et non les liens que nous observons au microscope, ce qui nous permet d'étudier des liens de taille submicronique.

Afin d'explorer les possibilités de cet outil, nous avons voulu étendre notre travail à un objet dont l'étude de l'élasticité n'a pu être explorée en raison (i)

de sa petite taille (ii) du fait que l'on ne peut en obtenir en quantité suffisante pour l'étudier comme un gel macroscopique. Nous avons ainsi choisi un système biologique, un sandwich anticorps/antigène/anticorps.

L'antigène considéré est le facteur de von Willebrand. Ce facteur est une glycoprotéine adhésive de fort poids moléculaire qui joue un rôle important dans l'hémostase primaire et le processus de coagulation [Jobin, 1995]. Il permet l'adhésion des plaquettes à l'endothélium ayant subi une déchirure, il est le transporteur du facteur VIII de coagulation. Il est constitué de sous-unités identiques ($M_W = 260$ kDa) reliées entre elles par des ponts disulfures et sa masse moléculaire varie de 520 kDa à 10 MDa. Le comportement mécanique du vWF dans le flux sanguin est important car il intervient dans la régulation de l'adhésion plaquettaire [Sadler, 1998].

L'IgG greffé sur les particules (anti-vWF IgG) est celui couramment employé dans les tests d'agglutination de billes de latex [Jobin, 1995] : il reconnaît spécifiquement les deux extrémités du vWF (Fig.3.21). Les particules greffées sont stables et se redispersent après application d'un champ magnétique. Après introduction du vWF, on n'observe aucune agrégation de particules en l'absence de champ. Lorsque l'on applique un champ magnétique, les particules s'organisent sous forme de chaînes. Au-delà d'une force magnétique seuil, les particules s'assemblent de façon irréversible. Le *collage* est donc *magnétiquement induit*. Ce phénomène est exploité pour faire du diagnostic : les tests d'agglutination sous champ décrits au chapitre I.4.

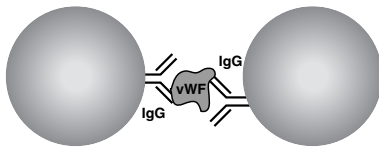


FIG. 3.21 – Sandwich IgG/facteur de von Willebrand/IgG

Les particules magnétiques utilisées font 103 nm de rayon et portent des fonctions COOH (Emulsion FPN ADEMTECH). L'IgG a été greffé de façon covalente sur les particules selon un protocole classique de couplage $\text{NH}_2\text{-COOH}$, détaillé en Annexe 3. La taille des particules est plus favorable à l'obtention d'un lien unique et permet aussi de mesurer plus facilement la taille du lien par diffraction de la lumière dans le visible (Chap.I.4.2). En effet, pour pouvoir observer dans le visible la lumière diffractée par une chaîne, la taille des particules doit être comprise entre 100 et 300 nm. Les particules sont toutefois un peu petites pour observer de belles épingles (voir chapitre précédent).

Un point crucial est le contrôle du nombre de liens entre les billes. Le vWF est contenu dans du plasma humain et sa concentration peut varier d'un lot à l'autre. Afin d'obtenir un lien unique nous avons donc préféré contrôler le nombre d'anti-corps que nous greffons sur les particules. Nous avons développé différents protocoles afin de quantifier le nombre de protéines greffées. Ils sont détaillés en

Annexe 4. Nous avons greffé 70 IgG par particules. Le lien formé est donc en moyenne un lien unique (voir encadré).

Détermination du nombre moyen de liens entre les particules

On a greffé 70 IgG par particule de 103 nm de rayon (r).

Soit 70 IgG par $4\pi r^2 = 13.3 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$. Un IgG occupe donc une surface de 1904 nm^2 . Assimilons cette surface à un disque de rayon R , soit $\pi R^2 = 1904 \text{ nm}^2$, d'où $R = 24 \text{ nm}$. Deux IgG sont alors distants de $d = 48 \text{ nm}$, comme le montre la Fig.3.22.

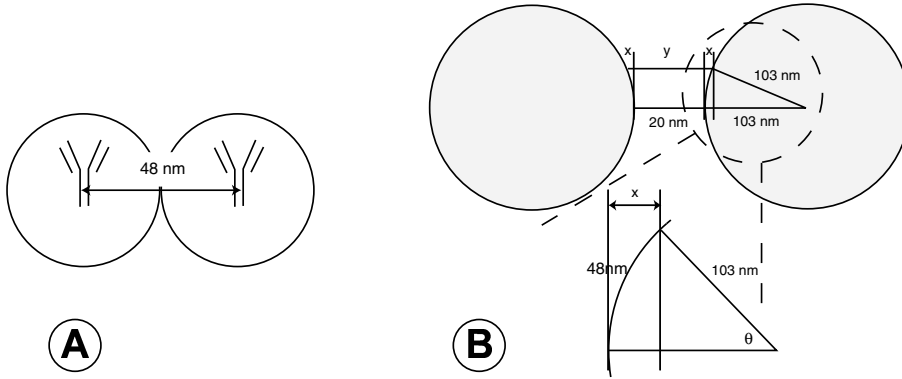


FIG. 3.22 – Distance entre 2 IgG greffés sur nos particules magnétiques. Ils occupent un disque de rayon 24 nm.

Considérons un lien formé entre deux particules adjacentes. La question est : sachant que deux IgG sont distants de 48 nm quelle doit être la longueur du deuxième lien ? Le problème est résumé Fig.3.22. Il convient de déterminer la distance $2x + y$ soit $2x + 20$. Soit θ l'angle correspondant à un arc de cercle de rayon 103 nm et de longueur 48 nm. On a alors : $103 \times \theta = 48 \text{ nm}$ soit $\theta = 0.47 \text{ rad}$. De plus, $103 \cos \theta = 103 - x$. D'où $x = 11 \text{ nm}$. Si un premier lien est formé, le deuxième lien (liant la paire d'IgG les plus proches) doit être de 42 nm. Or nous avons mesuré une longueur de lien entre particule de 20 nm. Avec la densité d'IgG greffés un deuxième lien n'est donc pas possible.

La Fig.3.23 montre que ce type de filaments forme également des épingles et que la courbure augmente avec le champ. Au microscope, on observe que les filaments obtenus fluctuent beaucoup, ils sont extrêmement flexibles.

On établit tout d'abord le profil force/distance permettant de déduire la longueur du lien (Fig.3.24.A). Le profil de force/distance est tracé pour (i) les particules fonctionnalisées COOH (ii) les particules greffées avec l'IgG et (iii) les particules greffées avec l'IgG en présence du vWF. Les courbes de (i) et (ii) sont pratiquement superposées ce qui justifie le fait que les particules ne portent pas beaucoup d'IgG. Comme attendu, le profil obtenu est un profil de forces électrostatiques variant comme : $F_{elec}(h) \propto \exp(-\kappa(h - 2a))$. L'ajout du vWF

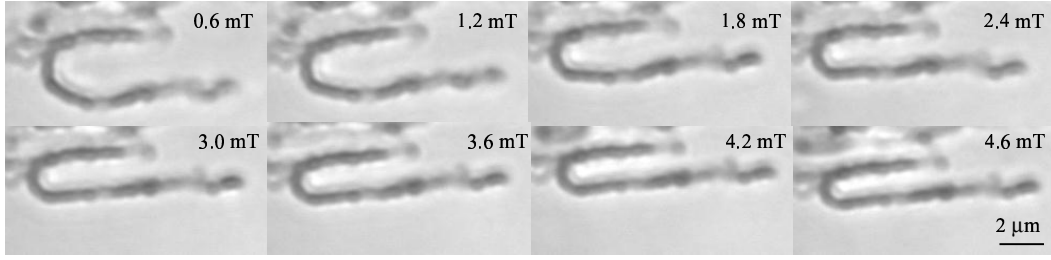


FIG. 3.23 – Filament soumis à un champ magnétique de plus en plus fort. Le filament est constitué de particules calibrées (Particules EPN, ADEMTECH, rayon 103 nm) collées les unes aux autres par un sandwich IgG/facteur von Willebrand/IgG.

crée des forces répulsives à longue distance qui sont dues au fait que l'antigène utilisé est une molécule de grande masse. La force magnétique permet de franchir une barrière répulsive et favorise alors la réaction de reconnaissance antigène/anticorps. Ceci explique pourquoi on obtient des filaments parfaitement linéaires (sans branchements ni agrégats formés en l'absence de champ ou à champ faible.)

La distance h sur la Fig.3.24.A représente la distance entre particules, centre à centre. En l'absence du vWF, le profil force/distance nous permet de déterminer le diamètre "cœur dur" : h_c . En présence du vWF, on note h la distance à partir de laquelle il y a formation de chaînes permanentes. La longueur l du lien est $h - h_c$ soit :

$$l=20 \text{ nm}$$

Les filaments fluctuent beaucoup en raison de la flexibilité du lien et de la petite taille des billes utilisées. Les images obtenues ne sont donc pas assez résolues pour être traitées par notre programme. Les filaments sont longs et leur longueur est grande devant le rayon de courbure de l'épingle. On peut alors considérer que le rayon de courbure vaut la moitié de la distance entre les deux brins de l'épingle. Pour mesurer le rayon de courbure, la solution consiste à faire la mesure de la distance entre brins sur un grand nombre de configurations d'une épingle (à champ fixé) puis d'en faire la moyenne. On trace ensuite le rayon de courbure d'une épingle en fonction du champ appliqué (Fig.3.24.B.). La courbe obtenue ne passe pas par l'origine : ceci peut être imputé au frottement des chaînes sur la surface de verre. On ajuste les résultats obtenus par une droite. De la pente $a=3.06 \cdot 10^{-5}$, on déduit $\kappa/l = 7.7 \cdot 10^{-19} \text{ J} = 200 k_B T$ (Equation 7).

Soit

$$\kappa= 1.5 \cdot 10^{-26} \text{ J.m}$$

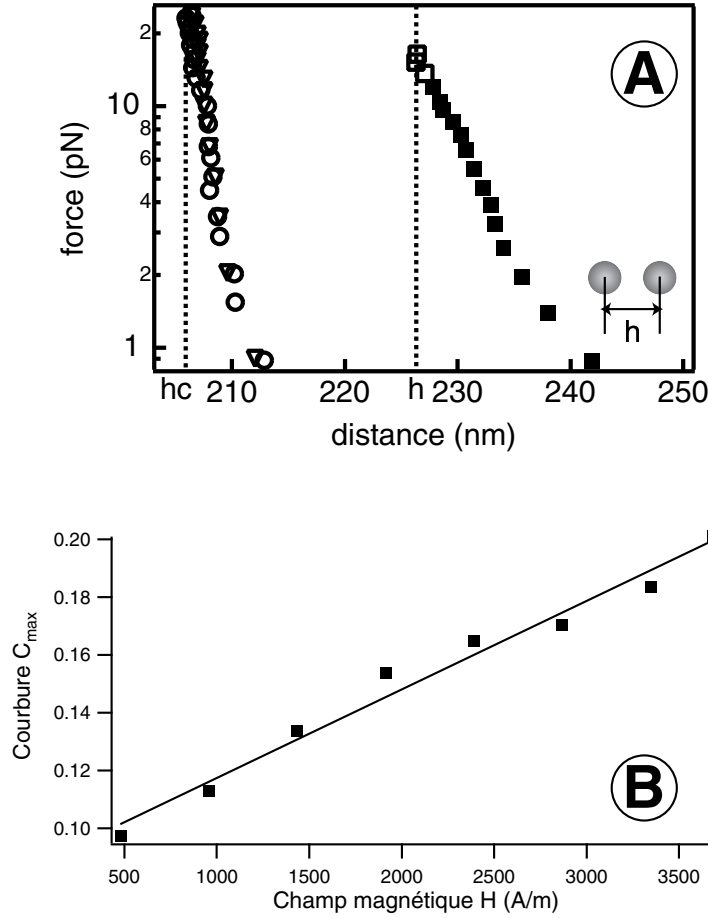


FIG. 3.24 – A : Mesures des forces colloïdales (pN) en fonction de la distance entre particules (nm) avec la "MCT". Les particules ont un rayon de 103 nm. $\circ$: particules carboxyliques dans un tampon phosphate 10 mM pH=7, Δ : particules greffées avec l'IgG (anti-vWF) dans un tampon phosphate 10 mM pH=7, $\blacksquare$: en présence de vWF, $\square$: cas où les chaînes deviennent permanentes. Expérience effectuée avec l'aide de R. Dreyfus. B : Courbure maximale adimensionnée ($2a/R$) de l'épingle en fonction du champ magnétique. Emulsion V2G (ADEMTECH) diamètre $0.75 \mu\text{m}$, PAA ($M_W=250\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) 0.1% en masse, NP10 0.1% en masse. $\blacksquare$: points expérimentaux; $-$: ajustement linéaire .

Si on compare cette rigidité de flexion à celle obtenue pour le caséinate de sodium on constate qu'elles diffèrent d'un facteur 10. Cette différence vient de l'origine de la colle : dans le cas du caséinate il s'agit d'adsorption alors que c'est de la reconnaissance spécifique pour le vWF. On peut déduire la longueur de persistance L_p du complexe : $L_p = \kappa/k_B T = 3.7 \mu\text{m}$. On sonde donc la flexibilité du complexe à des échelles plus petites que sa longueur de persistance.

En considérant que la limite entre le régime de flexion et celui de traction

correspond au contact des particules, on détermine la valeur limite de la courbure maximale à l'aide de l'équation 3.31 : $C_{max} = 0.85$. Les valeurs mesurées n'excèdent pas 0.20 (Fig.3.24.B.) : la colle est donc bien sollicitée en flexion.

Conclusions et Perspectives

Grâce à l'instabilité magnétique des filaments flexibles nous avons pu mesurer le module de flexion d'un sandwich de protéines. Jusqu'à présent, les études effectuées sur la flexibilité de protéines ne concernaient que des microfilaments. En effet les techniques utilisées sont basées sur l'observation en microscopie optique du filament déformé ce qui interdit l'étude d'objets submicroniques. La méthode que nous proposons s'affranchit de cette limitation : la déformation mesurée étant celle du filament de colloïdes magnétiques et non celle des objets flexibles liant les particules, nous pouvons examiner le comportement mécanique des très petits objets, à l'échelle de quelques nm. De plus les mesures effectuées sur les microfilaments, comme l'actine, exploitent le fait que c'est un polymère semi-flexible avec une longueur de persistance relativement grande ($\sim 15 \mu\text{m}$). Le module de flexion est déduit de la mesure de la longueur de persistance. Notre technique permet d'appliquer un couple élevé qui sollicite ainsi en flexion des objets à l'échelle moléculaire. On peut ainsi sonder la flexibilité d'objets à des échelles plus petites que leur longueur de persistance [Goubault et al., 2003].

Le manque de littérature concernant la flexibilité de petites molécules ne nous permet pas de discuter plus en détails nos résultats. Nous pensons que la flexibilité est un paramètre important qui n'a pas encore été exploité faute de technique. La flexibilité doit par exemple intervenir dans le mouvement et les configurations moléculaires qui sont essentiels dans les processus de reconnaissance moléculaire.

On peut toutefois comparer notre valeur à celles trouvées pour des biopolymères comme l'ADN, l'actine et les microtubules :

Objet	κ (J.m)
ADN double brin ($r=1\text{nm}$) [Smith et al., 1992]	2.10^{-28}
Filament Actine ($r=3\text{nm}$) [Isambert et al., 1995] [Gittes et al., 1993]	6.10^{-26}
IgG/vWF/IgG	$1.5 \cdot 10^{-26}$
Microtubules ($r=12\text{nm}$) [Kurz and Williams, 1995]	$1.5.10^{-23}$

Nous avons trouvé une valeur proche de celle de l'actine. Ainsi des protéines assemblées de façon linéaire (actine, complexe anticorps/antigène/anticorps) ont un module de flexion proche. Pour obtenir des filaments plus rigides, les protéines doivent s'assembler de façon plus complexe (hélices, adhésion latérale ...) comme les tubulines dans les microtubules.

Notons qu'il peut être intéressant de travailler dans le régime de traction qui permettrait alors de déplier des protéines pour comprendre la fonction physiologique de leur processus de dépliement/repliement [Rief et al., 1997].

Bibliographie

- [Arai et al., 1999] Arai, Y., Yasuda, R., Akashi, K.-I., Harada, Y., Miyata, H., Kinoshita, K., and Itoh, H. (1999). Tying a molecular knot with optical tweezers. *Nature*, 399 :446.
- [Bao, 2002] Bao, J. (2002). Mechanics of biomolecules. *J. Mech. Phys. Solids*, 50 :2237.
- [Biswal and Gast, 2001] Biswal, S. and Gast, A. (2001). Semiflexible chains of magnetic particles. *MicroTAS 2001, J.M. Ramsey and van der Berg, A. Eds, Kluwer Acad. Pub*, page 149.
- [Biswal and Gast, 2003] Biswal, S. and Gast, A. (2003). Mechanics of semiflexible chains formed by poly(ethylene glycol)-linked paramagnetic particles. *Phys. Rev. E*, 68 :21402.
- [Bressy, 2003] Bressy, L. (2003). *Elasticité et adhésion du caséinate adsorbé aux interfaces*. PhD thesis, Université Paris 6.
- [Cluzel et al., 1996] Cluzel, P., Lebrun, A., Heller, C., Lavery, R., Viovy, J.-L., Chatenay, D., and Caron, F. (1996). DNA : an extensible molecule. *Science*, 271 :792.
- [Dierckx, 1993] Dierckx, P. (1993). *Curve and surface fitting with splines*. Oxford Unvi. Press.
- [Furst and Gast, 1999] Furst, E. and Gast, A. (1999). Micromechanics of dipolar chains using optical tweezers. *Phys. Rev. Lett.*, 82 :4130.
- [Furst and Gast, 2000] Furst, E. and Gast, A. (2000). Micromechanics of magnetorheological suspensions. *Phys. Rev. E*, 61 :6732.
- [Gittes et al., 1993] Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biology*, 120(4) :923.
- [Goubault et al., 2003] Goubault, C., Jop, P., Baudry, J., Bertrand, E., Fermigier, M., and Bibette, J. (2003). Flexible magnetic filaments as micromechanical sensors. *Phys. Rev. Lett.*, 91(26) :260802.
- [Isambert et al., 1995] Isambert, H., Vernier, P., Maggs, A., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. *J. Bio. Chem.*, 270 :11437.

- [Jobin, 1995] Jobin, F. (1995). *L'hémostase*. Les Presses de l'Université Laval, Editions Maloine.
- [Jop, 2002] Jop, P. (2002). Etude de chaînes magnétiques permanentes. DEA Physique des Liquides, Université Paris 6.
- [Jop et al., 2003] Jop, P., Goubault, C., Derec, C., Baudry, J., Bertrand, E., Fermigier, M., and Bibette, J. (2003). Flexible magnetic filaments as micromechanical sensors. *MicroTAS 2003*, M. A. Northrup al. Eds, *Transducers Research Foundation Pub.*, 1 :159.
- [Kellermayer et al., 1997] Kellermayer, M. S. Z., Smith, S. B., Granzier, H. L., and Bustamante, C. (1997). Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 276 :1112.
- [Kishino and Yanagida, 1988] Kishino, A. and Yanagida, T. (1988). Force measurement by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*, 334 :74.
- [Kurz and Williams, 1995] Kurz, J. and Williams, R. (1995). Microtubule-Associated Proteins and the Flexibility of Microtubules. *Biochemistry*, 34 :13374.
- [Leal-Calderon et al., 1994] Leal-Calderon, F., Stora, T., Mondain-Monval, O., Poulin, P., and Bibette, J. (1994). Direct measurement of colloidal forces. *Phys. Rev. Lett.*, 72 :2959.
- [Melle et al., 2002] Melle, S., Calderon, O., Rubui, M., and Fuller, G. (2002). Rotational dynamics in dipolar colloidal suspensions : video microscopy experiments and simulations results. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, 102 :135.
- [Mondain-Monval et al., 1998] Mondain-Monval, O., Espert, A., Omarjee, P., Bibette, J., Leal-Calderon, F., and Philipp, J. and Joanny, J.-F. (1998). Polymer induced repulsive forces : an exponential scaling. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :1778.
- [Müller-Schulte et al., 1997] Müller-Schulte, D., Füss, F., De Cuyper, M., Häfeli, U., Teller, J., and Zborowski, M. (1997). *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*, volume p93. Plenum New York.
- [Philip et al., 1997] Philip, J., Mondain-Monval, O., Leal-Calderon, F., and Bibette, J. (1997). Colloidal force measurements in the presence of a polyelectrolyte. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 30 :2798.
- [Rief et al., 1997] Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F. Fernandez, J., and Gaub, H. (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276 :1109.
- [Riley et al., 1997] Riley, K., Hobson, M., and Bence, S. (1997). *Mathematical Method for Physics and Engineering*, volume p731. Cambridge Univ. Press.
- [Sadler, 1998] Sadler, J. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.*, 67 :395.

- [Semenov and Joanny, 1995] Semenov, A. and Joanny, J.-F. (1995). Structure of adsorbed polymer layers. Loops and tails. *Europhysics Letters*, 29(4) :279.
- [Silva et al., 1996] Silva, A., Bond, R., Plouraboué, F., and Wirtz, D. (1996). Fluctuation dynamics of a single magnetic chain. *Phys. Rev. E*, 54 :5502.
- [Smith et al., 1992] Smith, S. B., Finzi, L., and Bustamante, C. (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122.
- [Strick et al., 1996] Strick, T., Allemand, J.-F., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271 :1835.
- [Wiggins et al., 1998] Wiggins, C., Riveline, D., Ott, A., and Goldstein, E. (1998). Trapping and wiggling : elastohydrodynamics of driven microfilaments. *Biophys. J.*, 74 :1043.

En guise de préambule...

... au Chapitre 4

Ce Chapitre est consacré à l'obtention d'une matrice de séparation de cellules dans des microcanaux.

Nous avons vu au Chapitre 1 que les particules magnétiques, décorées de protéines spécifiques, permettent de trier des cellules en "batch". Ces particules peuvent s'auto-organiser en un réseau de colonnes dans un microcanal et constituer alors une matrice de séparation. Celle-ci est déjà utilisée avec succès pour séparer stériquement de l'ADN par électrophorèse.

Le savoir-faire décrit au Chapitre 2 a permis de consolider ce type de réseau pour l'adapter au tri de cellules sur puce. Les cellules migrent alors à travers une "forêt" de filaments flexibles fonctionnalisés avec des anticorps spécifiques aux cellules-cibles. Un tel dispositif est analogue à une colonne de chromatographie.

Chapitre 4

Auto-assemblages 3D pour le tri cellulaire

Depuis quelques années, l'intérêt va grandissant pour les "*laboratoires sur puces*¹". L'idée est de "rétrécir" le laboratoire d'analyses médicales à une puce de quelques cm² et de n'utiliser qu'une goutte de sang (au lieu des 1 à 2 tubes habituels) pour effectuer ces analyses. Une telle puce pourra être utilisée aussi bien à domicile que dans un laboratoire. Ces systèmes, porteurs de canaux gravés, intègrent de multiples opérations telles que détecter, transporter, mélanger et/ou caractériser des espèces (molécules, cellules,...) [Hong and Quake, 2003]. Les analyses réalisées ainsi sont plus rapides, automatisées, transportables, moins coûteuses et requièrent de faibles quantités de produits (de l'ordre de quelques μL). Un petit nombre de ces systèmes miniaturisés a déjà été commercialisé, par exemple la puce développée par la société BIOSITE pour diagnostiquer des crises cardiaques.

Nombres de techniques d'analyses conventionnelles ont ainsi été miniaturisées. Cependant, toutes ne sont pas transposables à l'échelle du micron. Il est donc nécessaire de créer de nouveaux outils/concepts pour manipuler les objets, les trier, les mélanger, les analyser.

Les particules magnétiques, de par leur taille et leur facile manipulation, sont particulièrement adaptées au monde de la microfluidique. Elles ont ainsi permis de manipuler des objets [Ikeuchi and Washizu, 2003], de développer des pompes [Ryu et al., 2003] et des mélangeurs [Rida et al., 2003, Rong et al., 2003] dans des microcanaux.

Dans cet esprit de miniaturisation, les modes de séparation commodes à l'échelle mésoscopique (centrifugation, filtration,...) ont dû être repensés. Ainsi de nouvelles matrices de séparation propres aux puces ont vu le jour. Forts d'un savoir-faire issu de la microélectronique, les laboratoires ont développé des réseaux de plots gravés "à façon" dans du silicium [Chen and Pépin, 2001]. La taille des

¹également appelés μTAS : Micro Total Analysis Systems.

pores de ces “gels artificiels” peut être adaptée à la taille des objets à séparer. Ceci a ainsi permis de séparer de longs ADN par électrophorèse (170 000 paires de bases) en quelques minutes [Tsuda et al., 2002] et selon des mécanismes nouveaux [Duke and Austin, 1997].

Les particules magnétiques permettent également de réaliser une *matrice de séparation* : introduites dans un canal, elles s’*auto-organisent* réversiblement en un réseau de colonnes sous l’effet d’un champ magnétique appliqué perpendiculairement au canal (Fig.4.1). [Liu et al., 1995] ont montré que l’espacement entre colonnes dépend de la hauteur du canal tandis que l’épaisseur des colonnes varie avec la concentration en particules². On peut donc considérer ce réseau de colonnes comme une matrice de séparation dont la taille des pores (*i.e.* l’espacement entre les colonnes) peut être adaptée en fonction de la tailles des objets à séparer.

Cette matrice a été utilisée avec succès pour séparer en taille de longs ADN (150 000 pb) par électrophorèse [Doyle et al., 2002a]. Quand l’ADN rencontre une colonne, il s’enroule, sous forme de “U” autour de celle-ci. Le temps qu’il met à se désengager dépend de sa taille : plus il est long, plus le temps de désengagement est long. Avec un contrôle précis des flux, nous avons pû réaliser des séparations très reproductibles d’ADN d’une centaine de kilos de paires de bases en une durée de l’ordre de la minute [Doyle et al., 2002b] [Minc et al., 2004]. Les séparations sont aussi efficaces que celles réalisées avec des plots gravés [Kaji et al., 2003].

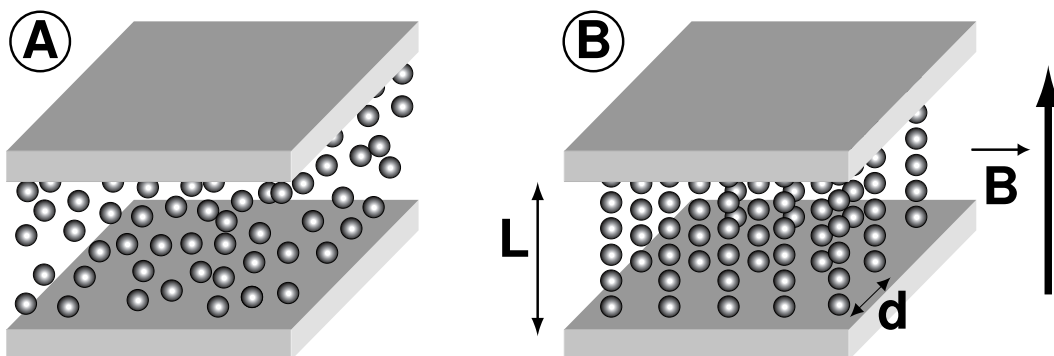


FIG. 4.1 – Auto-organisation de particules magnétiques sous champ : placées entre deux plans, les particules s’auto-assemblent en un réseau de colonnes régulièrement espacées lorsque le champ est appliqué perpendiculairement aux plans. Cette organisation est réversible : le réseau (B) retourne à l’état liquide (A) quand le champ magnétique est annulé.

Les matrices magnétiques offrent une alternative peu coûteuse aux systèmes fabriqués par microlithographie qui requièrent des équipements lourds (salle

²Cette organisation résulte de différentes interactions : (i) les interactions dipolaires qui conduisent à la formation d’une chaîne (ii) les interactions entre colonnes voisines qui sont majoritairement répulsives et qui augmentent l’espacement entre colonnes [Lawrence et al., 1994].

blanche, microscope électronique,...) et un savoir-faire certain. De plus, une fois le champ magnétique annulé, une simple surpression suffit pour rincer la suspension de particules, ce qui permet de réutiliser les canaux.

Notre objectif est d'utiliser ce type de matrice magnétique pour séparer des cellules. La séparation se fait alors non pas de façon stérique mais par *affinité*. L'idée est donc de fonctionnaliser les colonnes avec des anticorps spécifiques de la population cellulaire à capturer et d'effectuer ce que l'on peut appeler une "*chromatographie de cellules*". Une des applications intéressante serait la capture de cellules rares pour la détection de cancers. La taille de telles cellules est souvent inhomogène d'où le choix de les capturer par des interactions spécifiques.

Dans ce qui va suivre, nous présenterons tout d'abord les méthodes conventionnelles utilisées pour séparer les cellules puis les systèmes microfluidiques dédiés au tri cellulaire. Nous énoncerons ensuite les critères requis pour la matrice de séparation. Nous verrons comment le savoir-faire concernant la fabrication de chaînes permanentes (voir Chapitre 2) a permis de développer une matrice de séparation adaptée au tri de cellules. Enfin, nous décrirons le comportement de cellules passant à travers la matrice.

4.1 Tri cellulaire

Le tri cellulaire est principalement employé :

- (i) soit pour purifier le prélèvement d'un patient. On peut ainsi vouloir purifier la moelle osseuse d'un patient qui va subir une thérapie toxique pour cette dernière : pour cela, on prélève un échantillon de moelle avant que le patient ne soit traité, puis une fois le traitement administré, on réinjecte la moelle préalablement débarrassée des cellules cancéreuses [Haukanes and Kvam, 1993].
- (ii) soit pour isoler des cellules à des fins d'études ou de diagnostic. On peut, par exemple, vouloir prélever des cellules d'intérêt comme les cellules souches de la moelle osseuse ou du sang.

Afin de trier des cellules, il faut au préalable identifier le meilleur critère pour les différencier. Cela peut être, par exemple, leur densité, leur taille ou leurs marqueurs de surface (comme par exemple les *CD* (Classe de Différentiation) molécules dont la présence sur la membrane cellulaire des leucocytes identifie une cellule ou révèle son état fonctionnel).

Actuellement quatre techniques sont majoritairement utilisées : la filtration, la centrifugation, la cytométrie en flux et la séparation immunomagnétique. Elles sont efficaces dans la majorité des cas mais s'avèrent limitées quand il s'agit d'isoler des événements rares avec une très grande sélectivité.

Parfois la concentration en cellules est très basse (de l'ordre de une pour un million), on parle alors de *cellules rares*. C'est par exemple le cas des *micrométastases* : quelques cellules tumorales isolées, disséminées dans l'orga-

nisme à partir d'une tumeur primitive (Fig.4.2), et non détectables par les techniques classiques d'anatomohistopathologie. Ces micrométastases conduisent au développement secondaire de métastases, alors décelables cliniquement mais généralement fatales (11 300 décès en France de récurrence du cancer du sein en 2000). Il a été récemment établi que la présence de micrométastases était un facteur pronostic de la récurrence métastatique [Braun et al., 2000]. Il est donc important de pouvoir les repérer et les quantifier, afin d'établir un diagnostic, de les éliminer mais également de pouvoir les étudier afin de déterminer leur mode de fonctionnement.

Illustrons la difficulté de capturer de telles cellules avec le cas des micrométastases médullaires issues d'un cancer du sein. L'équipe de N. Blin (Institut Curie, UMR 144) dispose de prélèvements de moelle osseuse de 7 mL. Un prélèvement contient de 50 à 250 10^6 cellules et la proportion de cellules métastasées est de 1 à 10 par million de cellules suivant le stade de la maladie. Les études de ces métastases nécessitent 50 à 1000 cellules. Il faut donc être capable de récupérer toutes les cellules métastasées sachant qu'en plus aucun marqueur très spécifique n'a été identifié. C'est cette problématique qui a stimulé notre démarche.

Dans la suite, nous présenterons les techniques conventionnelles du tri cellulaire puis celles développées dans le domaine de la microfluidique. Les méthodes mettant en jeu des particules magnétiques (excepté le tri en "batch"), que ce soit dans des dispositifs macroscopiques ou microfluidiques, seront détaillées dans un troisième paragraphe.

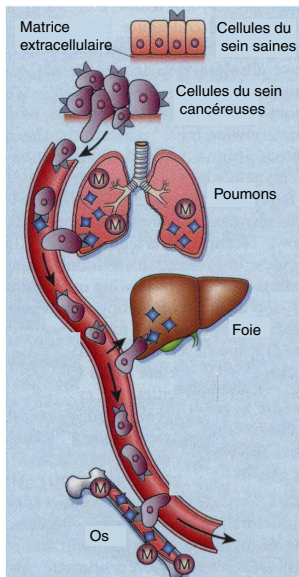


FIG. 4.2 – Schéma du profil métastatique du cancer du sein. La lettre *M* représente les micrométastases. Une patiente atteinte d'un cancer du sein risque ainsi de développer des métastases dans les os et dans les poumons. Extrait de [Liotta, 2001]

4.1.1 Techniques conventionnelles

4.1.1.a Centrifugation et Filtration

Centrifugation La séparation repose sur les différences de vitesse de sédimentation entre cellules, en fonction de leur taille et de leur densité.

Les tubes de centrifugation sont préalablement remplis d'un gel à gradient (continu ou non, 1–1,320 g.mL⁻¹) de densité (la densité la plus importante est au fond du tube). Les cellules sont déposées en haut du tube ou mélangées dans le gel. La vitesse et le temps de rotation dépendent du type d'échantillon. Les cellules migrent dans le tube et s'arrêtent dans la zone du gel dont la densité est identique à la leur. Afin de ne pas endommager les cellules le gel ne doit pas être toxique, ne doit pas affecter leur fonction et morphologie, doit avoir la même osmolarité que le cytoplasme (~ 290 mOsm). La présence du gel ne doit pas perturber les études ultérieures. Percoll, Ficoll, Nycodenz, OptiPrep sont les milieux commerciaux généralement utilisés.

Cette technique est couramment utilisée : peu chère, elle permet également de séparer de grandes quantités de cellules. Elle est souvent employée comme étape de pré-purification.

Filtration Il s'agit de séparer les cellules selon leur taille à l'aide d'un filtre. Il faut pour cela que les cellules à isoler soient homogènes en taille.

Cette méthode est peu appliquée en cancérologie du fait de l'hétérogénéité en taille des cellules cancéreuses. Toutefois, P. Paterlini-Bréchet a mis au point une technique, Iset (*Isolation by Size Epithelial Tumor Cells*), qui a permis de séparer des cellules épithéliales cancéreuses plus grosses que les autres cellules du sang [Vona et al., 2000]. La jeune société METAGENEX exploite cette technologie pour isoler les cellules présumées d'origine fœtales contenues dans le sang maternel [Vona et al., 2002], en vue d'un diagnostic prénatal de dépistage d'anomalies chromosomiques.

Les techniques suivantes reposent sur le principe de séparation par affinité.

4.1.1.b Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (ou *Fluorescence Activated Cell Sorter*, FACS) est une technique qui permet le dénombrement et l'analyse de particules en suspension dans un milieu liquide.

Cette technique est généralement appliquée à des cellules. L'intérêt est de pouvoir mesurer simultanément, à une cadence de plusieurs milliers d'événements par seconde, plusieurs paramètres tels que la taille, la granularité et l'émission de fluorescence à plusieurs longueurs d'onde.

Grâce à une légère surpression, la suspension à analyser arrive dans une tubulure qui assure le centrage hydrodynamique du jet. Les cellules passent alors une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser. La lumière (diffusée, réémise) est collectée à 90° et aux petits angles au moyen de photomultiplicateurs.

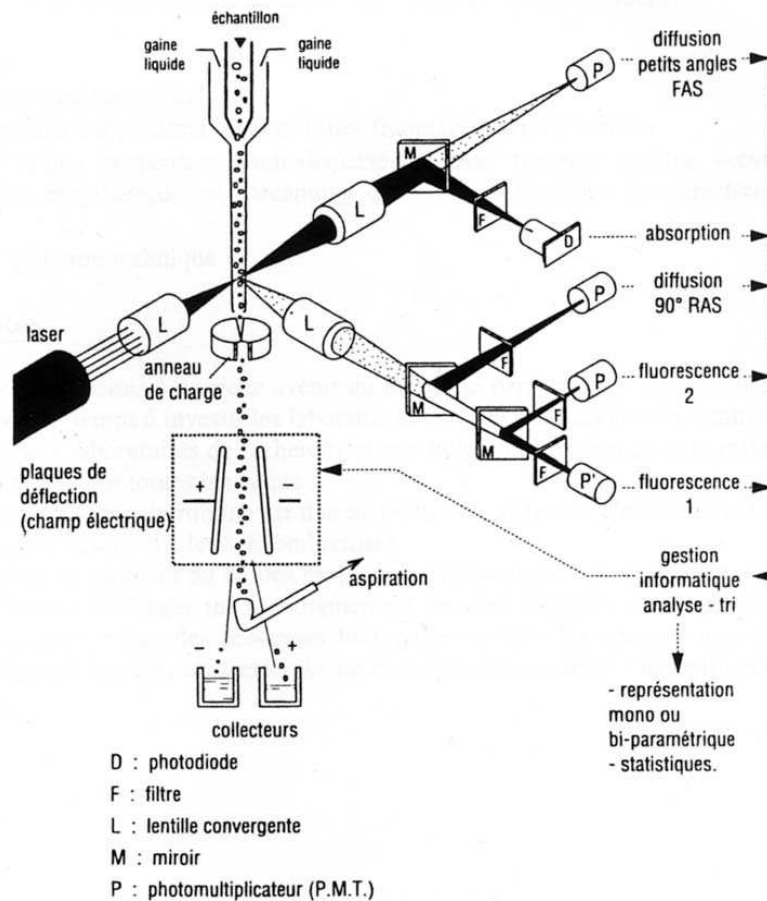


FIG. 4.3 – Principe du fonctionnement d'un cytomètre à flux.

Sur les trieurs de cellules, le jet sort par un orifice d'environ $70\text{-}100\ \mu\text{m}$ de diamètre. Un générateur de vibrations (dispositif ultrasonore piézo-électrique) permet le fractionnement du jet en gouttelettes ne contenant qu'une seule cellule. Les gouttes sont chargées, ce qui permet de les dévier avec un champ à haute tension créé entre deux plaques. Les cellules sont ainsi triées et recueillies dans des tubes à essais ou des plaques de microtitration (Fig.4.3). Cette partie est la plus délicate car il ne faut placer qu'une seule cellule par goutte et ce quelle que soit la forme ou la taille de la cellule. De plus, les gouttes doivent être chargées de façon identique pour que la déviation vers le tube collecteur soit correcte.

Le cytomètre est un outil performant mais qui requiert des investissements lourds tant financiers (€100 000) qu’humains (un technicien spécialisé).

Le tri de cellules par cytométrie en flux n’est pas adapté dès que les évènements recherchés sont trop rares [de Wynter et al., 1995]. Dans ce cas, la méthode consiste à pré-purifier l’échantillon par séparation magnétique. On arrive ainsi à séparer une cellule sur mille voire une sur dix mille si le flux de cellules est lent (moins de 200 cellules/s contre 7 à 20 000 cellules/s quand le cytomètre est utilisé pour de l’analyse).

4.1.1.c Séparation immunomagnétique

Rappelons brièvement le principe de cette méthode largement décrite dans le premier chapitre. Des particules magnétiques fonctionnalisées avec un anticorps dirigé spécifiquement contre les cellules d’intérêt sont introduites dans l’échantillon. A l’aide d’un gradient de champ, on sépare les cellules liées aux particules magnétiques des autres cellules³. Le tri peut être *positif* (capture des cellules d’intérêt) ou *négatif* (autrement appelé *déplétion* : on capture les autres cellules).

Le gradient de champ est réalisé le plus souvent avec un simple aimant placé sur le côté du tube contenant l’échantillon : les cellules magnétiquement marquées sont concentrées sur la paroi du tube. Il suffit alors de remplacer la phase continue en pipétant (Fig.4.4).

Les particules développées par la société MILTENYI sont petites (10-50 nm) donc faiblement magnétiques. Les cellules passent dans une colonne contenant un réseau de fils fins en fer doux (“paille de fer”) afin d’obtenir des forts gradients de champ (Fig.4.5). Les cellules magnétiquement marquées sont retenues dans la colonne alors que les autres sont éluées. Afin de récupérer les cellules capturées dans la colonne, il suffit alors d’annuler le champ magnétique.

Cette méthode est extrêmement simple, ne nécessite pas de matériel lourd et est peu coûteuse.

La quantité de particules magnétiques introduite doit être ajustée en fonction du nombre de cellules et du nombre de récepteurs. Lorsque l’on souhaite capturer toutes les cellules rares présentes dans un échantillon, on doit utiliser des quantités importantes de particules magnétiques afin d’augmenter les chances de capture. Les cellules capturées sont alors recouvertes d’une coque de particules magnétiques, ce qui nuit à leurs études ultérieures (Fig.4.6.A) notamment par observations microscopiques (immunohistochimie). [Sarda et al., 2004] étudient l’interaction particules magnétiques/cellules afin de comprendre les mécanismes de reconnaissance mis en jeu.

L’idéal serait que les cellules capturées portent peu de particules magnétiques

³La force magnétique appliqué est de la forme : $\vec{F}_m = (\vec{m} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B}$ où m est le moment magnétique d’une particule et $\vec{B}$ le champ magnétique appliqué.

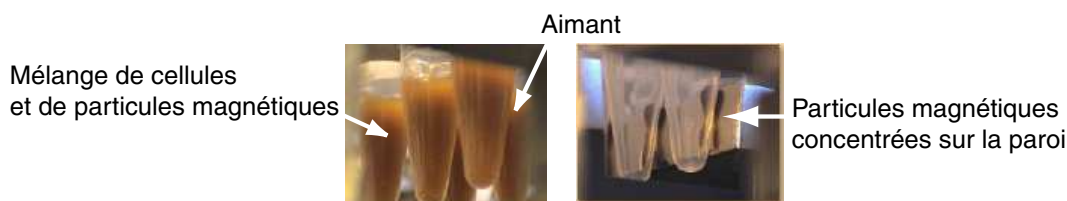


FIG. 4.4 – Séparation magnétique. A : des particules magnétiques sont mise en présence de l'échantillon dans des tubes Eppendorf lesquels sont placés devant un aimant. B : au bout de quelques secondes, les particules magnétiques sont concentrées contre la paroi des tubes ce qui permet d'extraire facilement la phase continue. Extrait de www.dynal.no

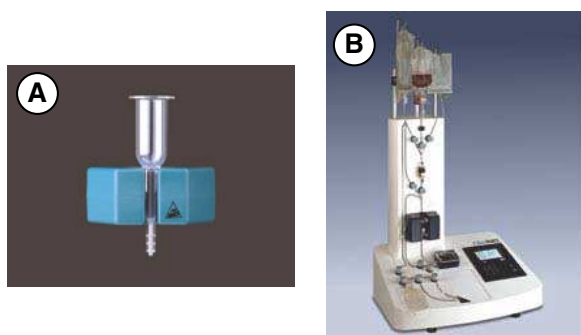


FIG. 4.5 – Séparateurs de la société MILTENYI. A : colonne contenant de la limaille de fer placée au coeur d'un aimant (MiniMACS™). B : séparation de cellules dans un système clos et stérile (CliniMAC®).

(Fig.4.6.B.). Un compromis doit donc être fait entre la quantité de cellules capturées et l'état de la cellule après capture. La solution est de réitérer plusieurs fois le tri, si possible avec d'autres critères (par exemple, d'autre marqueurs).

Ces méthodes magnétiques montrent parfois un défaut de sélectivité dû :

- à de l'adhésion non spécifique. Il faut alors travailler sur la chimie de surface des particules pour limiter cet effet ;
- au drainage hydrodynamique lié au déplacement des particules dans le fluide. Des cellules non marquées magnétiques se trouvent entraînées dans le culot de particules magnétiques.

Parfois les cellules capturées sont comprimées fortement dans le culot ce qui peut les endommager.

Nous verrons comment l'utilisation d'un réseau de particules magnétiques auto-organisées, au sein duquel les cellules vont migrer, doit permettre de palier à ces défauts (non spécifique, drainage hydrodynamique, compression des cellules).

Dans [Patel, 2001], le lecteur trouvera les détails et protocoles des différentes techniques décrites précédemment ainsi que d'autres méthodes telles que la séparation par affinité (non magnétique), l'électrophorèse (FFE, Free Flow Electrophoresis)...

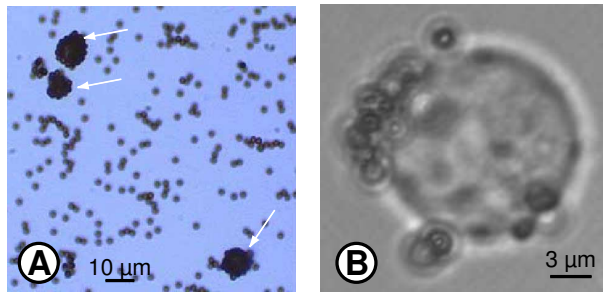


FIG. 4.6 – A : cellules carcino-
mateuses (provenant de prélèvements
de moelle osseuse) recouvertes de
particules magnétiques (Dynal, 2.8
 μm). Cliché N. Blin (IC/UMR
144). B : cellule CD3^+ (lignée
Jurkat) capturée par des parti-
cules magnétiques (ADEMTECH,
0.9 μm). Cliché C.G.

4.1.2 En microfluidique

Les progrès de la microfabrication ont permis l'élaboration de véritables laboratoires sur puce capables d'intégrer un grand nombre de fonctions (tri de cellules, lyse, purification d'ADN, analyse de protéines...) sur de faibles volumes. Deux types de démarche ont été abordés : (i) miniaturiser des techniques déjà existantes (ii) développer des concepts nouveaux propres aux puces. On illustrera ces deux approches avec l'exemple de la cytométrie en flux miniaturisée et la séparation par diélectrophorèse.

4.1.2.a μ Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est un moyen performant pour l'analyse et le tri de cellules mais l'appareillage est volumineux et cher. La miniaturisation d'un tel système permet (i) de diminuer le coût et la taille, (ii) d'augmenter la sensibilité, et (iii) d'intégrer d'autres modules comme la culture des cellules triées, une directe amplification par PCR...

Le principe est le même que la version macroscopique : des cellules immunomarquées (avec des fluorophores) passent une à une devant un détecteur qui analyse le signal. On note deux modifications majeures. La première concerne la façon dont les cellules sont alignées : certains dispositifs utilisent la focalisation hydrodynamique comme dans la version conventionnelle [Lee et al., 2001], d'autres la focalisation électrocinétique [Fu et al., 2002], [Lee et al., 2003] comme illustré Fig.4.7. La deuxième modification porte sur le tri de cellules : les cellules ne sont plus éjectées dans des gouttes chargées pour être ensuite recueillies dans des tubes à essais ou des plaques de microtitration, elles sont tout simplement déviées dans un canal de récupération pour être ensuite cultivées ou analysées [Wolf et al., 2000]. Cette méthode est plus efficace que la méthode conventionnelle pour laquelle la formation de gouttes contenant une seule cellule et chargées identiquement demeure difficile. Il faut toutefois vérifier que les fortes intensités de champ électrique utilisées ne perturbent pas les cellules.

La sensibilité est augmentée du fait que la région analysée est plus petite

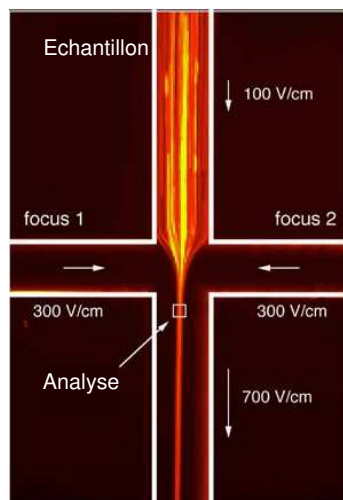


FIG. 4.7 – Transport de particules (particules de $1.88 \mu\text{m}$ de diamètre, marquées avec des fluorophores) dans une microchambre de focalisation. Les flèches représentent la direction des flux et leur longueur est proportionnelle à la vitesse du fluide dans chaque canal. Les intensités des champs utilisés pour la focalisation sont de 100 V/cm et 300 V/cm . L’efficacité de la détection dépend du rapport des intensités des champs électriques entre le canal principale et le canal de focalisation [Jacobson and Ramsey, 1999].

et mieux contrôlée et que la planéité du système permet d’utiliser des optiques à grande ouverture numérique [Chou et al., 1999], voire une détection confocale [Dittrich and Schwille, 2003]. [Fu et al., 2002] ont développé un algorithme dédié au tri de cellules rares : les cellules passent très rapidement devant le détecteur mais quand une cellule rare est détectée, le flux est arrêté puis change de direction afin d’amener la cellule dans le canal de récupération (Fig.4.8). Ceci permis de trier les cellules à “haut débit”⁴.

4.1.2.b Diélectrophorèse

La diélectrophorèse (DEP) est la translation d’objets neutres, polarisables électriquement, due à l’application d’un champ électrique non uniforme. Elle est dite *négative* lorsque le milieu est plus polarisable que la particule. Dans ce cas, la particule va se déplacer vers le minima du champ électrique via le mouvement des dipôles localisés dans le milieu. Dans un milieu non polarisable, l’objet se déplacera vers un maximum de champ. C’est la diélectrophorèse *positive*.

Il est donc possible de piéger des particules. Le laboratoire BIOPUCE du CEA de Grenoble a ainsi développé MeDICS, un dispositif sans canal sur lequel les cellules sont en lévitation, capturées dans des “cages DEP” (Fig.4.9). Un réseau de microélectrodes permet de manipuler chaque cellule indépendamment des autres. Il ne s’agit donc pas vraiment de tri de cellules mais plutôt d’isolement de quelques cellules d’intérêt [Fuchs et al., 2003].

L’utilisation d’un champ électrique alternatif permet, en ajustant la fréquence du champ et la nature du milieu, de jouer sur le signe de l’effet diélectrophorétique⁵. [Frénéa et al., 2002] ont ainsi séparé 2 lignées cellulaires

⁴Le débit des μFACS est actuellement beaucoup plus faible ($20 \text{ cellules.s}^{-1}$) que celui des FACS conventionnels

⁵Une sphère neutre soumise à un champ électrique continu non uniforme subit une force F

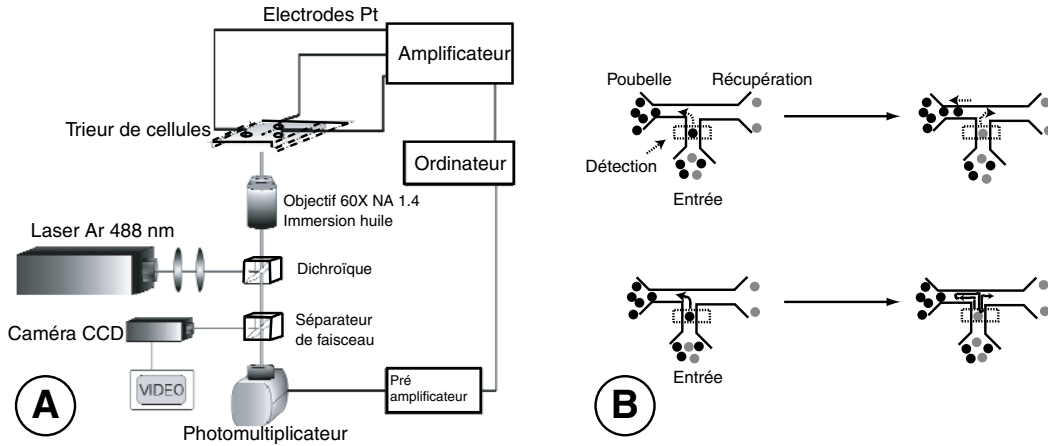


FIG. 4.8 – A : μ FACS développé par l'équipe de S.R. Quake (Caltech, Californie). B : 2 moyens de trier les cellules. En haut : dès qu'une cellule est détectée, le flux est commuté et la cellule va directement dans le canal de récupération (faible débit). En bas : les cellules passent rapidement devant le détecteur et sont ensuite dirigées vers la "poubelle". Quand un évènement est détecté, le flux est arrêté puis inversé de telle sorte que la cellule repasse devant le détecteur puis est dirigée vers le canal de récupération. Cet algorithme est dédié au tri de cellules rares. Extrait de [Chou et al., 1999].

(lignée Jurkat et lignée PC-3).

[Becker et al., 1995] ont montré que les propriétés diélectriques de cellules métastasées du cancer du sein (lignée MDA231) sont différentes de celles des erythrocytes et des lymphocytes T. La séparation se fait dans une colonne dite d'affinité diélectrique. Les conditions sont réglées afin qu'une population cellulaire soit retenue (diélectrophorétiquement) à l'intérieur de la colonne et l'autre éluée (Fig.4.10). Leur prototype trie 10^3 cellules par seconde.

Cette technique, appelée "*Dielectrophoretic Field-Flow-Fractionation*" ou DEP-FFF [Wang et al., 2000], présente l'avantage de pouvoir séparer des cellules sans avoir recours à un marquage. Ceci est intéressant quand le marquage des cellules nuit à leur utilisation ultérieure ou quand les récepteurs de surface sont inconnus ou identiques entre deux lignées. Par contre, cette méthode nécessite

telle que

$$F = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2$$

où α est la différence de polarisabilité entre la sphère et le milieu.

Lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué, l'expression de la force devient :

$$F = 2\pi a^3 K \nabla E^2$$

où a est le rayon de la sphère et K est le facteur de Clausius-Mosotti, qui dépend de la fréquence du champ et des constantes diélectriques complexes du milieu et de la particule.

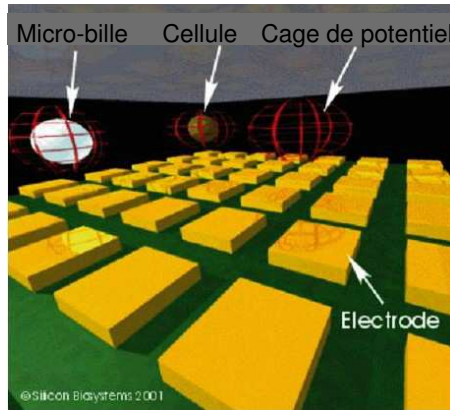


FIG. 4.9 – Cages DEP de forme sphérique générées par un réseau de microélectrodes. Ces cages permettent de capturer et manipuler des objets neutres maintenus en lévitation. Extrait de www-dsv.cea.fr.

d'étudier au préalable les propriétés diélectrophorétiques des cellules susceptible d'être contenues dans l'échantillon à analyser. De plus, il est difficile de jouer sur la nature du milieu pour induire des différences entre les cellules⁶.

D'autres exemples de séparation diélectrophorétique de cellules sont présentés dans [Fiedler et al., 1998], [Xu et al., 1999] et [Huang et al., 2002] (puce plus complexe permettant d'obtenir le profil d'expression des gènes des cellules séparées).

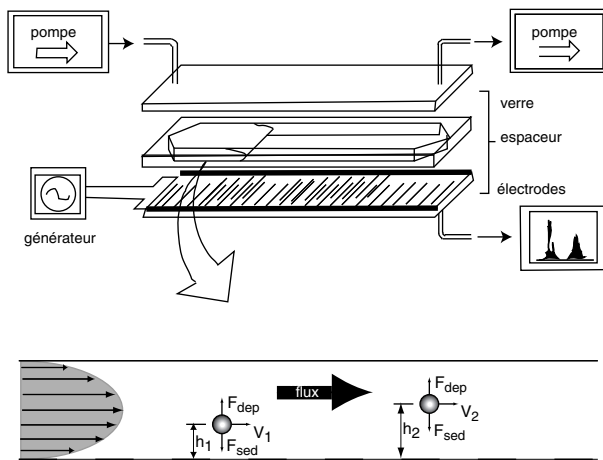


FIG. 4.10 – Principe de la DEP-FFF. Deux types de cellules lèvitent à des hauteurs d'équilibre différentes sous l'influence de la force diélectrophorétique (F_{DEP}) et la force de gravité (F_{sed}). Un pousse-seringue impose un flux hydrodynamique qui entraîne les cellules à des vitesses différentes (V_1 , V_2) suivant leur position (verticale) dans le canal. Extrait de [Wang et al., 2000]

4.1.3 Séparation immunomagnétique

Toutes les méthodes présentées dans ce paragraphe reposent sur le même principe que la séparation magnétique en "batch" : des cellules marquées avec

⁶Il faut des milieux permettant la survie des cellules. Les champs appliqués étant forts, ces milieux ne doivent contenir que peu de sels. Le choix des milieux est donc restreint.

des particules magnétiques sont séparées à l'aide d'un gradient de champ. Seuls les volumes mis en jeu et la configuration du champ changent d'un exemple à l'autre.

La société IMMUNICON développe une plateforme destinée à l'analyse de cellules, le CelltracksTM, basée sur la séparation immunomagnétique, l'alignement des cellules et la détection par épifluorescence [Tibbe et al., 2001]. Un prélèvement de sang est incubé avec des marqueurs fluorescents et des particules magnétiques (75 nm de rayon, Immunicon Corporation) dirigés contre des leucocytes. L'échantillon est ensuite introduit dans un canal ($4 \times 0.5 \times 30$ mm, L,H,l) dont la paroi supérieure comporte des lignes de nickel déposées par lithographie. L'espacement entre les lignes est de la taille d'une cellule. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, les cellules portant des particules magnétiques migrent vers le haut du canal tandis que les cellules non marquées descendent par gravité (Fig.4.11). Quand les cellules magnétiquement marquées atteignent la paroi supérieure du canal, elles s'alignent sous l'effet d'un fort gradient de champ exercé par les fils de nickel. Les cellules ainsi alignées sont alors indentifiées et comptées à l'aide d'un laser qui scanne le canal. Ce système est destiné à la détection de cellules rares telles que les micrométastases et les cellules fœtales.

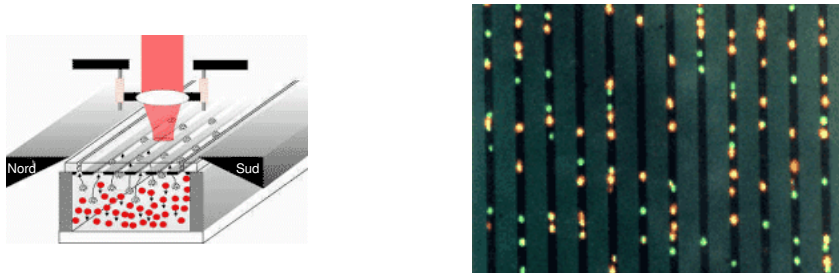


FIG. 4.11 – Principe du système développé par la société IMMUNICON. Par application d'un champ magnétique adéquat, les cellules immunomagnétiquement marquées sont attirées vers la paroi supérieure du canal. Les cellules non marquées, tombent progressivement par gravité. Une fois que les cellules ont atteint le haut du canal, elles sont alignées à l'aide d'un fort gradient de champ induit par des fils de nickel. Elles sont alors analysées par épi-fluorescence (les cellules sont préalablement marquées avec des fluorophores). Extrait de www.immunicon.com.

[Chalmers et al., 1998] séparent les cellules *en continu* à l'intérieur de cylindres coaxiaux placés au sein du champ magnétique formé par un quadripôle (noté *QMS* pour “*Quadrupole Magnetic Flow Sorter*”). Le champ formé est approximativement centro-symétrique. Les cellules magnétiquement marquées sont déviées vers la paroi externe du cylindre (Fig.4.12.A). Le tri peut être (i) *binaire*, séparation de cellules marquées de l'échantillon à haut débit [Zborowski et al., 1999] ou (ii) *fractionné*, les cellules sont séparées en fonction du nombre de particules

magnétiques qu'elles portent. Ce nombre est relié à leur densité d'antigènes de surface [McCloskey et al., 2001] [McCloskey et al., 2003]. En effet, [McCloskey et al., 2000] ont déterminé théoriquement et expérimentalement les différences de mobilité magnétophorétique⁷ de cellules immunomagnétiquement marquées⁸. Des séparations ont été effectuées sur des systèmes cellulaires modèles, réalisés en mélangeant des quantités connues de cellules de cancer du sein à du sang [Nakamura et al., 2001]. Les résultats sont encourageants, toutefois la géométrie du système ainsi que l'intensité du flux hydrodynamique doivent être optimisées. Un grand effort est porté sur le marquage des cellules avec des particules magnétiques afin de les distinguer suivant leur taux d'expression d'antigènes de surface. Un tel tri fractionné semble peu probable en raison de la grande variabilité du taux d'expression d'antigènes de surface (cycle cellulaire, environnement, stress).

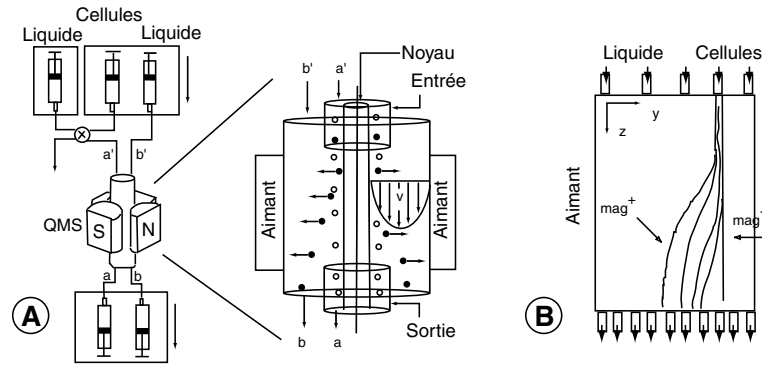


FIG. 4.12 – Trieur de cellules mis au point par les équipes de J. Chalmers et M. Zborowski. A : séparation de cellules dans un quadripôle. Les cellules marquées magnétiquement sont déviées. B : déviation de cellules selon la quantité de particules magnétiques portées donc selon la densité d'antigènes de surface.

[Austin, 2001] ont transposé l'idée des “cliquets entropiques”, utilisés pour la séparation d'ADN [Duke and Austin, 1998], au tri de cellules : une force agit à un certain angle du flux hydrodynamique et dévie ainsi les objets d'intérêt. Le système consiste en un réseau de fins fils magnétiques formant un angle de 45° avec la direction du flux hydrodynamique imposé. La longueur des fils magnétiques est très petite ($10 \mu\text{m}$) ce qui permet d'obtenir un fort gradient de champ à leurs extrémités. Les cellules préalablement marquées (immunomarquage) avec des particules magnétiques (50 nm de diamètres) sont déviées et contraintes de bouger le long des fils (Fig.4.13) ce qui permet de les séparer des cel-

⁷la mobilité magnétophorétique, μ , est définie par $\mu = v / (|\nabla B^2| / 2\mu_0)$ où v est la vitesse de la cellule dans le fluide, B le champ magnétique et μ_0 la perméabilité du vide.

⁸La mobilité magnétophorétique est reliée à la capacité des cellules à lier des anticorps (greffés sur des particules magnétiques).

lules non marquées donc non déviées. Ce dispositif est en cours de développement, certains paramètres, tels que les forces hydrodynamiques/forces magnétiques, le marquage des cellules, devant être optimisés.

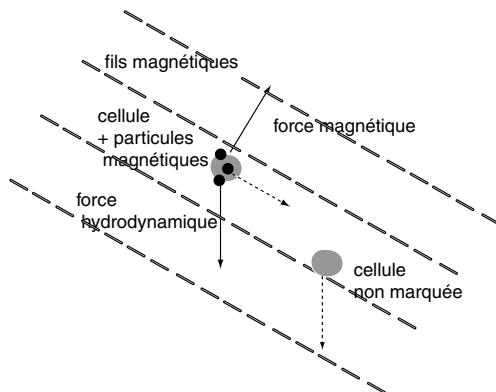


FIG. 4.13 – Principe du dispositif développé par l'équipe de R.H. Austin : un fort gradient de champ (produit par les fils magnétiques) crée une force à un certain angle du flux de cellules. Les cellules marquées avec des particules magnétiques sont ainsi déviées et migrent le long des fils.

D'autres exemples peuvent être trouvés dans [Chronis et al., 2001], [Karumanchi et al., 2002].

Certaines cellules, comme les erythrocytes⁹, possèdent des propriétés magnétiques [Zborowski et al., 2003] ce qui évite de les marquer magnétiquement. Des dispositifs dont le principe est analogue à ceux présentés précédemment (un gradient de champ dévie les cellules magnétiques) ont été mis au point [Roath et al., 1990, Haik et al., 1999]. Les champs mis en jeu sont alors très importants : de l'ordre du Tesla.

4.2 Auto-assemblages 3D pour le tri cellulaire : principe

Notre idée est de faire migrer un mélange de cellules à travers un réseau de colonnes magnétiques. Les cellules se déplacent grâce à un flux hydrodynamique¹⁰. Les colonnes magnétiques sont fonctionnalisées avec des anticorps dirigés

⁹la forme désoxygénée est paramagnétique tandis que la forme oxygénée (oxyhémoglobine) est diamagnétique. En présence d'un champ magnétique extérieur, les corps non-ferromagnétiques s'aimantent très faiblement, soit dans le sens du champ magnétique ce sont les corps paramagnétiques, soit dans le sens contraire du champ magnétique ce sont les corps diamagnétiques. Dans les deux cas l'aimantation induite est faible (mille fois moins qu'un corps ferromagnétique; aimantation d'un corps diamagnétique cent fois moins importante que celle d'un corps paramagnétique) et réversible.

¹⁰Remarque quant au choix du mode de mise en mouvement des cellules au travers des colonnes : un flux hydrodynamique est préférable à une traction électrophorétique pour laquelle un traitement de surface limitant les flux électroosmotiques est nécessaire. Ce traitement de surface constitue une étape supplémentaire qui doit être effectuée sur les parois du canal et sur les colonnes (chargées) et peut donc cacher les anticorps présents sur celles-ci.

spécifiquement contre les marqueurs de surface des cellules à capturer. Les cellules n'ayant pas d'affinité pour les colonnes vont traverser le canal sans s'arrêter alors que les autres vont être ralenties par les interactions spécifiques "anticorps des colonnes/marqueurs cellulaires" (Fig.4.14).

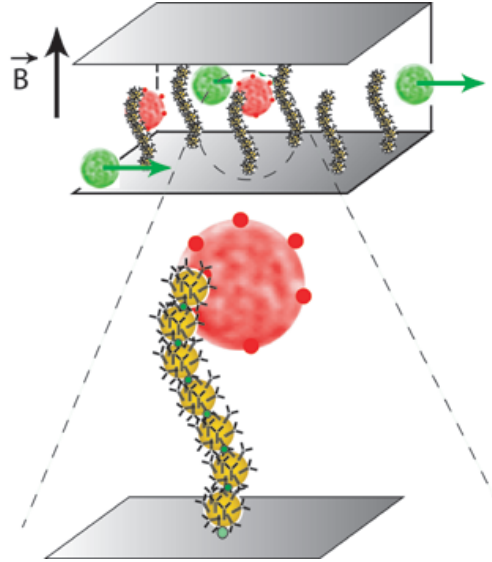


FIG. 4.14 – Principe de séparation de cellules dans un réseau de colonnes magnétiques. Les colonnes sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques de la population cellulaire à capturer. Les cellules cibles réagissent avec les colonnes (interactions spécifiques ligand/récepteur), alors que les autres migrent sans être arrêtées.

L'ajout de colonnes magnétiques augmente de façon considérable la surface spécifique de capture par rapport à une simple chambre à flux.

Réaliser une chromatographie de cellules dans des microcanaux, où une sous-population est ralentie par des interactions spécifiques avec une surface, est une idée également proposée par d'autres groupes :

- [Chang et al., 2002] s'inspirent du phénomène de recrutement des leucocytes au voisinage de sites infectieux en réalisant des plots microgravés dans du silicium (carrés : $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ ou rectangulaires : $10\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$) qu'ils recouvrent de E-selectine (protéine qui se lie aux leucocytes). Un flux hydrodynamique est imposé avec un pousse-seringue ($700\text{--}1400\ \mu\text{m.s}^{-1}$) pour faire circuler des cellules au travers du canal (lignée cellulaire HL-60). Les vitesses de passage au sein des zones fonctionnalisées sont mesurées par microscopie optique en fonction de la géométrie des plots et de la vitesse du flux imposée. L'idée sous-jacente est d'utiliser le ralentissement (par roulement sur la paroi comme dans les mécanismes de défense immunitaire) des leucocytes pour les séparer des autres cellules présentes dans un prélèvement sanguin ;

- [Furdui and Harrison, 2002] proposent un système relativement analogue au nôtre : des particules magnétiques sont immobilisées dans une zone d'un canal microfluidique à l'aide de deux aimants placés de part et d'autre du canal.

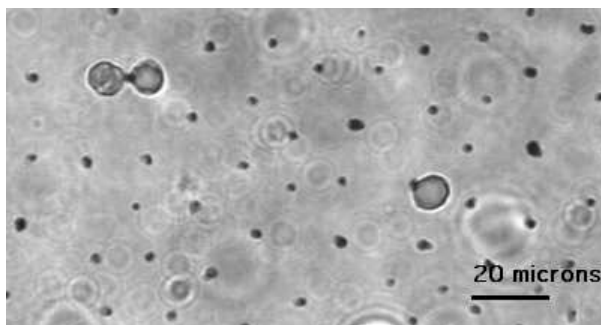
Leur système ne permet cependant pas d'élucider ni la structure du filtre ni ce qui s'y passe : il fonctionne comme une "boîte noire".

Le dispositif que nous proposons (i) est *plus facile* à réaliser (pas besoin d'équipements lourds, colonnes auto-organisées), (ii) présente une *grande surface de capture* (colonnes fines, de l'ordre du micron, et nombreuses), (iii) possède une *matrice adaptable* en jouant sur le pas du réseau (type de cellules, efficacité de capture, débit) et (iv) permet de *visualiser* les phénomènes mis en jeu lors de la séparation.

Afin d'illustrer le phénomène de capture spécifique, nous avons fait migrer des erythrocytes, dont certains ont été biotinylés [Merkel et al., 1999], au travers d'un réseau de colonnes fonctionnalisées avec de la streptavidine (Uptibeads, UPTIMA, UPR 9020). Malgré la désorganisation du réseau au passage des erythrocytes (Fig.4.17), les erythrocytes biotinylés (marqués avec le fluorophore Di6ASPBS¹¹) sont immobilisés immédiatement et durablement sur les colonnes (Fig.4.15) alors que ceux non biotinylés traversent la matrice.

Nous avons abandonné ce système à cause de la mauvaise stabilité des particules et du fait que le couple streptavidine/biotine possède une trop forte affinité pour se révéler être un bon modèle des types de liaisons que nous voulons utiliser par la suite.

FIG. 4.15 – Erythrocytes biotinylés (via leurs groupements NH_2 de surface) capturés par des colonnes de particules fonctionnalisées avec de la streptavidine (Uptibeads, UPTIMA, UPR 9020)



4.3 Caractéristiques du réseau

La matrice de séparation doit répondre à certains critères nouveaux (par rapport à ceux nécessaires à la séparation stérique de longs ADN) pour être adaptée aux contraintes imposées par le tri cellulaire :

¹¹Colorant lipophile synthétisé par Mireille Blanchard-Desce, Université de Rennes

Fonctionnalisation du réseau La séparation doit s'effectuer selon un critère d'affinité (interactions spécifiques ligand/récepteur). Il faut donc *connaître les marqueurs de la population que l'on souhaite isoler*. Il suffit alors de greffer sur les colonnes les anticorps dirigés contre ces marqueurs. Nous avons décrit dans le Chapitre 2 la possibilité de greffer des protéines sur des particules et sur des chaînes irréversibles. Nous redétaillerons plus loin les méthodes employées pour ce faire.

Résistance du réseau Des expériences préliminaires ont consisté à faire migrer des vésicules lipidiques¹² ou des érythrocytes dans un réseau réversible¹³ (Fig.4.16). On en a conclu qu'il est nécessaire d'ancrer le réseau. En effet, lorsque les objets (vésicules, érythrocytes) entrent en collision avec les colonnes, ils les emportent sur leur chemin. Rendre les colonnes permanentes ne suffit pas : elles sont également emportées. Nous avons observé que les rares colonnes fixées, "*par accident*", par leur extrémité inférieure à la paroi du canal résistaient au passage des érythrocytes.

Objets	Particules	Concentration	Phase continue	Champ électrique	Champ magnétique	Hauteur canal
Vésicules	V2G (Ademtech)	1% en volume	Glucose+Sucrose 310 mOsm	15 V/cm	15 mT	100 μm
Erythrocytes	V2G (Ademtech)	5% en volume	Phosphate buffer 10mM pH=7.3 +Sucrose+ NP10 0.1% en masse	15--30 V/cm	15 mT	10 μm

FIG. 4.16 – Bilan des conditions expérimentales des premières migrations effectuées avec des vésicules et des érythrocytes dans des réseaux réversibles. Dans les premières expériences, nous utilisons le champ électrique afin de faire migrer les objets. Par la suite, nous avons choisi d'appliquer un flux hydrodynamique pour les raisons évoquées en note 11.

Nous avons développé deux types de réseaux *ancrés* :

- *le réseau irréversible* : nous utilisons le savoir-faire acquis sur l'obtention de chaînes irréversibles (voir le Chapitre 2) pour construire, directement dans le canal, des colonnes irréversibles qui s'attachent par une extrémité à la paroi inférieure du canal. Lorsque le champ magnétique est annulé, les colonnes demeurent et tombent sous leur propre poids ;

¹²Vésicules géantes unilamellaires de quelques dizaines de microns de diamètre, constituées de DOPC (Di Oleyl Phosphatidyl Choline) et marquées avec le fluorophore Di6ASPBS (Mireille Blanchard-Desce, Université de Rennes). Elles ont été utilisées pour mimer des cellules et fournies par Pierre-Henri Puech, Equipe F. Brochard, Institut Curie UMR 168.

¹³On rappelle qu'un réseau *réversible* est un réseau de particules magnétiques qui retourne à l'état "liquide" lorsque le champ magnétique est annulé, contrairement au réseau *irréversible* dont la structure est maintenue.

- *le réseau réversible* : seule la première particule de la colonne est attachée. Pour ce faire, un dépôt de particules est effectué sur la paroi inférieure du canal. Un réseau réversible s’auto-assemble sur ce dépôt. Lorsque le champ magnétique est annulé, les particules retournent en suspension. *Le développement de ce réseau fait l’objet du stage de D.E.A. de Florence Thivilliers et ne sera pas présenté ici.*

Actuellement, Charlie Gosse (Laboratoire de Photonique et Nanostructures, Marcoussis) travaille sur une solution alternative au dépôt de particules, soit l’élaboration d’un canal dont la paroi inférieure est incrustée de plots magnétiques régulièrement espacés.

Pas du réseau Placées entre deux plans parallèles et soumises à un champ magnétique (perpendiculaire aux plans), les particules magnétiques s’auto-organisent sous forme de colonnes régulièrement espacées, formant ainsi un réseau quasi-hexagonal. Un réseau adapté au tri cellulaire doit être formé de colonnes hautes d’une centaines de microns et espacées de 15-20 μm , ceci afin que la circulation des cellules à travers le réseau soit fluide (Fig.4.17).

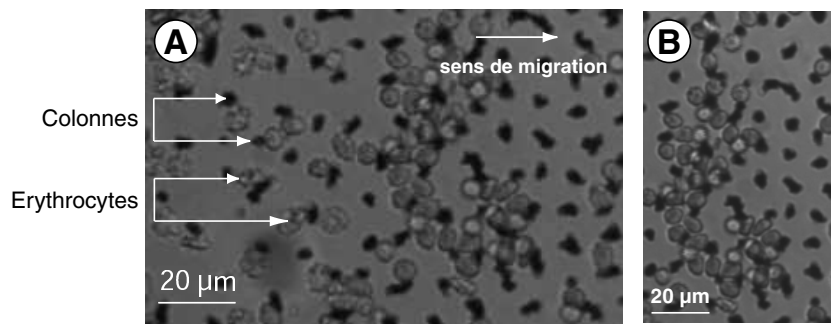


FIG. 4.17 – A : érythrocytes migrant à travers un réseau de colonnes. Ils emportent les colonnes sur leur passage. B : le pas du réseau n’est pas adapté, les érythrocytes sont bloqués dans le canal.

Un tel réseau ne peut pas être obtenu avec n’importe quelles particules magnétiques : elles doivent être fortement magnétiques et de taille comprise entre 0.5 μm et 0.9 μm . Si les particules sont grosses et peu magnétiques, alors la hauteur des colonnes est faible (1-2 particules de hauteur). Si les particules sont trop petites, les colonnes ne sont pas assez rigides.

Sur le marché, peu de billes répondent à ces critères. Nous avons sélectionné les particules ADEMTECH (i) lot V2G pour l’obtention du réseau irréversible (ii) lot 1000B3, pour réaliser le réseau réversible.

Notons que le réseau n’a pas besoin d’être parfaitement régulier car le tri se fait selon un critère d’affinité et non de taille.

4.4 Montage expérimental

4.4.1 Montage

Le montage (Fig.4.18) consiste en un canal droit en PDMS (Annexe 7). L'une des extrémités du canal est reliée à une seringue Hamilton de 250 μL montée sur un pousse-seringue (KD Scientific, modèle 120). L'autre extrémité est connectée à un capillaire de silice (Polymicro technologie, diamètre externe 340 μm , diamètre interne 180 μm) coudé avec une pièce métallique¹⁴. Un tube Eppendorf est placé au bout du capillaire. Nous pouvons ainsi faire passer différentes substances (particules magnétiques, réactifs, cellules...) dans le canal simplement en changeant de tube Eppendorf. Le canal est placé au coeur d'une bobine montée sur un mi-

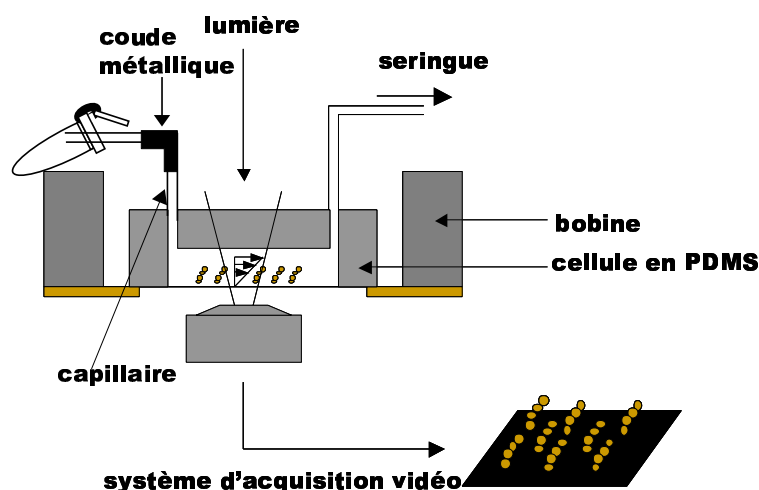


FIG. 4.18 – Montage expérimental.

croscopie inversé (Leica DMIL, objectifs 20 $\times$ et 40 $\times$). La visualisation se fait à l'aide d'une caméra CCD (COHU). Les images sont enregistrées et traitées avec le logiciel Scion Image.

4.4.2 Produits

Particules magnétiques Les particules magnétiques (Lot V2G) nous ont été fournies par la société ADEMTECH : ce sont des particules non polymérisées de diamètre 0.75 μm . La phase continue est une solution de triton X405 à 2.1 g/L. La concentration de particules est de 5% en volume.

¹⁴Technique mise au point par Aurélien Bancaud (Equipe Viovy, Institut Curie, UMR168).

Modèle cellulaire Un prélèvement de moelle ou de sang est un système trop compliqué pour mettre au point notre matrice magnétique. Afin de régler les paramètres expérimentaux (pas du réseau, solidité du réseau, intensité du flux hydrodynamique) nous avons choisi le modèle cellulaire suivant :

- *Lymphocytes T* : lignée Jurkat (clone 20), elles sont $CD3^{+15}$ pendant 1 mois. Au-delà, une sous-population exprimant moins CD3 apparaît. Ces cellules seront retenues par les colonnes magnétiques greffées avec des IgG anti-CD3.
- *Lymphocytes B* : lymphome de Burkitt, lignée Raji B, elle sont $CD3^{-}$. Ces cellules sont censées n’avoir aucune interaction avec les colonnes.

La taille de ces deux types de cellules est comparable ($\simeq 10 \mu m$).

Ces deux lignées nous ont été offertes par l’équipe de C. Hivroz (Institut Curie, INSERM 520, Biologie cellulaire de l’immunité tumorale). Elles sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 avec du glutamax (INVITROGEN, ref 61870010) auquel sont ajoutés 10 % de serum de veau fœtal (INVITROGEN, ref 16000044). Elles sont placées dans des flacons ventilés à 37° avec 5% de CO_2 . La concentration doit être comprise entre 250 000 cellules/mL et 10^6 cellules/mL.

Anticorps Les colonnes magnétiques sont fonctionnalisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les marqueurs CD3 des lymphocytes T (anticorps UCHT1, IgG1 provenant de la souris). Cet anticorps est préparé et nous est fourni par C. Hivroz (Institut Curie, INSERM 520).

4.5 Réseau irréversible

Nous voulons développer un réseau ayant les caractéristiques établies ci-dessus, soit un réseau *solide*, adapté à la *taille des cellules* et *fonctionnalisé* avec des anticorps spécifiques des cellules à capturer [Goubault et al., 2002].

Au Chapitre 2, nous avons présenté l’obtention de filaments irréversibles solides. Ces filaments sont réalisés par collage *magnéto-stimulé* entre particules magnétiques recouvertes de polymère (PAA, $250\,000\text{ g.mol}^{-1}$) [Goubault et al., 2003a]. Nous avons montré qu’il est également possible de greffer des anticorps sur de tels objets.

L’idée est d’ancrer ces filaments (i) de façon *solide*, à la paroi inférieure du canal et (ii) de les ancrer *espacés de 15 à 20 μm* (Fig.4.19).

Pour ce faire, nous avons utilisé la même “colle” que celle qui relie solidement les particules entre elles, le PAA.

Ce dernier ne s’adsorbe pas spontanément sur le verre ou sur le PDMS. Nous avons donc eu recours à un dépôt couche par couche de polyélectrolytes

¹⁵Classe de Différentiation 3, molécules dont la présence sur la membrane cellulaire des leucocytes identifie une cellule ou révèle son état fonctionnel. L’exposant + ou - indique la présence ou non des molécules CD3 sur la cellule considérée.

[Decher, 1997]. Ainsi, les parois du canal ont été recouvertes au préalable par de la poly-L-lysine, un polycation. Les particules magnétiques dispersées dans une solution de PAA sont alors introduites dans le canal ainsi traité. Le PAA s'adsorbe sur les particules et sur les parois du canal. Lorsqu'un champ magnétique (d'une quinzaine de mT) est appliqué, *les particules s'auto-organisent en réseau de colonnes irréversibles qui vont s'ancrer sous leur propre poids* (Fig.4.20).

Le poids joue, entre la colonne et la surface, le rôle de la force magnétique qui permet d'approcher les particules suffisamment près les unes des autres pour que le polymère les ponte. L'intensité de la force à appliquer pour approcher les deux surfaces des particules d'au moins 25 nm [Philip et al., 1997] dépend de la quantité de PAA adsorbé et du temps pendant lequel cette force est appliquée.

FIG. 4.19 – Réseau irréversible ancré : colonnes magnétiques irréversibles ancrées sur la paroi du canal (particules magnétiques V2G, ADEMTECH).

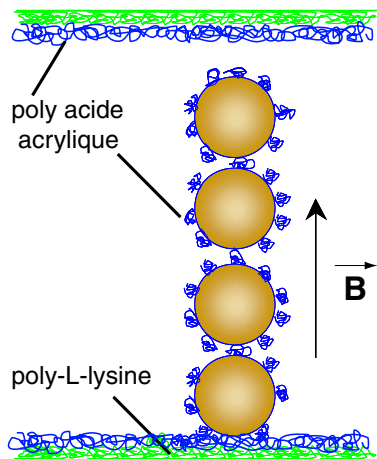
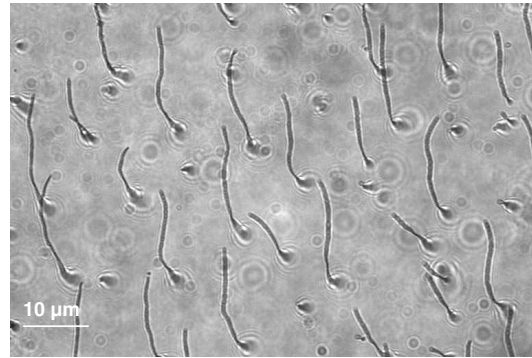


FIG. 4.20 – Principe d'obtention d'un réseau irréversible ancré. Le PAA s'adsorbe sur la poly-L-lysine qui recouvre les parois du canal. Sous champ magnétique, les particules s'auto-assemblent en colonnes régulièrement espacées. Le champ magnétique permet également de coller de façon irréversible les particules, recouvertes de PAA (collage magnéto-stimulé). Ces colonnes irréversibles s'ancrent ensuite sous leur propre poids.

Nous allons montrer comment ajuster la concentration en particules et la hauteur du canal afin d'obtenir des colonnes "lourdes" espacées de $\sim 20\mu\text{m}$.

4.5.1 Pas du réseau

Pour que la circulation des cellules à travers le réseau de colonnes soit fluide, l'espacement entre colonnes doit être de l'ordre de grandeur d'une cellule, soit 15-20 μm .

D'après [Liu et al., 1995] l'espacement d entre colonnes varie comme $d=1.3L^{0.37}$, L étant la hauteur du canal. Le pré-facteur dépend de la susceptibilité magnétique du ferrofluide. Nous avons repris ces expériences : nous avons fait varier l'épaisseur du canal à concentration de particules constante (Particules V2G, Adetmech, 1 % en volume).

Mode opératoire Les particules (V2G, ADEMTECH, 1 % en volume) sont introduites par capillarité dans des capillaires de 2 cm de long et de section carrée : 10×10 μm , 50×50 μm , 100×100 μm , 200×200 μm , 400×400 μm , 500×500 μm , 600×600 μm (Vitrocom Inc.). Le capillaire est posé sur une lamelle de microscope puis scellé sur celle-ci avec une colle qui réticule sous UV (voir Annexe 2). L'ensemble est ensuite placé au coeur de la bobine posée sur la platine du microscope. On applique un champ de 25 mT pendant 5 min. L'espacement entre colonnes est mesuré "à la main" sur photo.

Résultats Si on porte en $\ln/\ln$ les mesures, on obtient une droite (Fig.4.21) qui correspond à $d=3L^{0.29}$. Nos matériaux étant plus magnétiques (susceptibilité magnétique supérieure) que ceux utilisés par Liu et al., il est normal que la valeur du pré-facteur soit plus élevée (plus les gouttes sont magnétiques et plus les répulsions latérales entre colonnes sont importantes donc plus l'espacement entre colonnes est grand).

Commentaires On constate qu'à partir de 400 μm le réseau évolue dans le temps : les colonnes "fusionnent" quand elles se rencontrent (diffusion). On constate que la physique est différente de celle en milieu confiné : il n'y a plus de répulsion latérale et donc si les colonnes diffusent et qu'elles se rencontrent, elles se collent (c'est ce qui se passe dans un tube Eppendorf).

Si on arrive à figer les colonnes quand on le désire, on peut imaginer laisser les colonnes fusionner puis les fixer quand les caractéristiques requises du réseau (épaisseur des colonnes, espacement entre colonnes) ont été atteintes. Ce phénomène peut être utilisé afin d'obtenir des pas de réseau grands.

Conclusion Il est donc physiquement possible d'obtenir le pas de réseau adéquat. Il faut pour cela que la hauteur du canal soit *supérieure à 200 μm et inférieure à 400 μm* . Il reste à déterminer la quantité de particules à utiliser pour que le réseau s'ancre sous son propre poids. Nous rappelons que la quantité de particules et la hauteur de canal sont liées : pour chaque hauteur de canal,

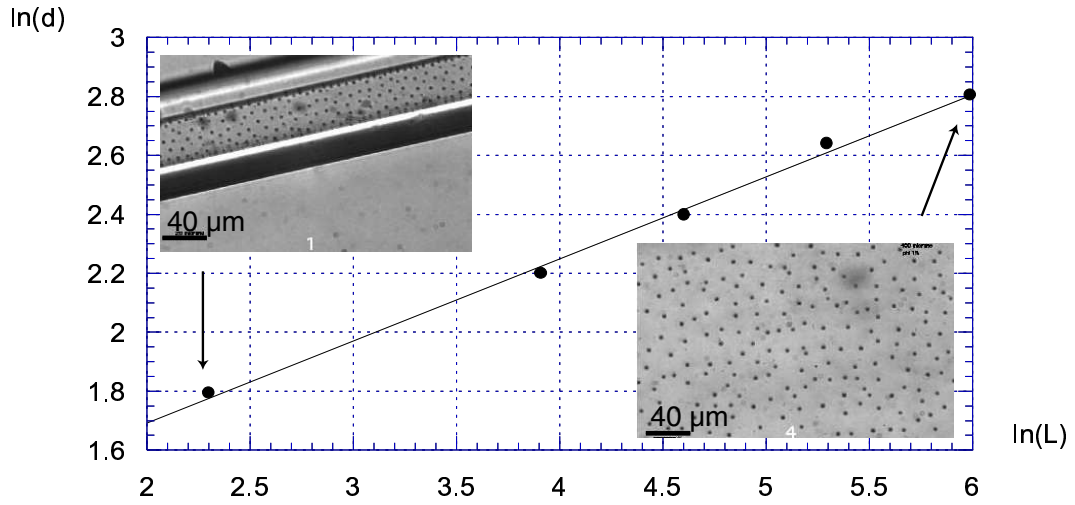


FIG. 4.21 – Variation du pas du réseau (d , en μm) en fonction de la hauteur du canal (L , en μm). La concentration des particules est de 1 % en volume (particules V2G, ADEMTECH). Ces points s'ajustent par une droite d'équation : $\ln d = 1.13 + 0.29 \ln L$ ($R = 0.998$). Clichés du réseau pour $L = 10$ et $400 \mu\text{m}$.

la quantité de particules à mettre pour que les colonnes soient suffisamment "lourdes" est différente.

4.5.2 Epaisseur des colonnes – Solidité

Dans nos conditions d'expérience¹⁶ nous avons observé que le poids d'une colonne de 200–300 μm de haut (d'une particule de diamètre) ne suffit pas à l'ancrer¹⁷. Il faut donc faire des colonnes *épaisses* (au moins deux particules de diamètre) pour espérer qu'elles s'ancrent sous l'effet de leur propre poids.

En effet, il est plus facile et plus efficace d'augmenter le poids d'une colonne en la rendant plus épaisse qu'en la faisant plus haute : la longueur maximale des chaînes est de l'ordre de 200 μm et ce quelle que soit la hauteur L du canal. Pour $L > 200 \mu\text{m}$, les colonnes n'atteignent pas le haut du canal :

¹⁶Les particules sont placées dans la phase continue contenant le PAA, puis introduites dans le canal. Il s'écoule au moins 5 minutes, avant que le champ soit appliqué. Nous attendons 10-15 minutes pour appliquer un flux hydrodynamique afin de vérifier si les colonnes sont solidement ancrées.

¹⁷Considérons une colonne mono-goutte d'une centaine de microns de haut. Le poids de cette colonne est : $P = N\rho a^3 \frac{4}{3}\pi g$ où N est le nombre de particules dans une colonne, ρ , la différence de densité entre les particules et le milieu $\sim 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$, a leur rayon $\simeq 0,35 \mu\text{m}$, et g , l'accélération de la pesanteur $= 9,8 \text{ m.s}^{-2}$.

Ceci donne, pour une chaîne de 200 μm : $P \simeq 0.5 \text{ pN}$ ($N \sim 267$) et pour une chaîne de 500 μm : $P \simeq 1.5 \text{ pN}$ ($N \sim 667$).

- soit parce que l’on ne travaille pas à une concentration de particules suffisamment élevée ;
- soit à cause de la gravité, *i.e.* les billes commencent à sédimenter avant l’application du champ magnétique.

L’obtention de colonnes épaisses se fait en augmentant la fraction volumique de particules magnétiques, à hauteur de canal fixe [Liu et al., 1995]. Il faut toutefois ne pas dépasser une concentration critique au-delà de laquelle les particules s’organisent en un “labyrinthe” (Fig.4.22). Une telle organisation est inadaptée à la séparation car les cellules peuvent rester piégées dans des “cul-de-sac”.

Remarque Un gradient de champ qui exercerait sur les colonnes une force attractive “vers le bas” pourrait remplacer le rôle de la gravité. En effet, si on place un aimant sous l’échantillon situé dans la bobine une fois les chaînes formées, alors celles-ci s’ancrent mais s’emmêlent également, et ce en raison de l’orientation des lignes de champs.

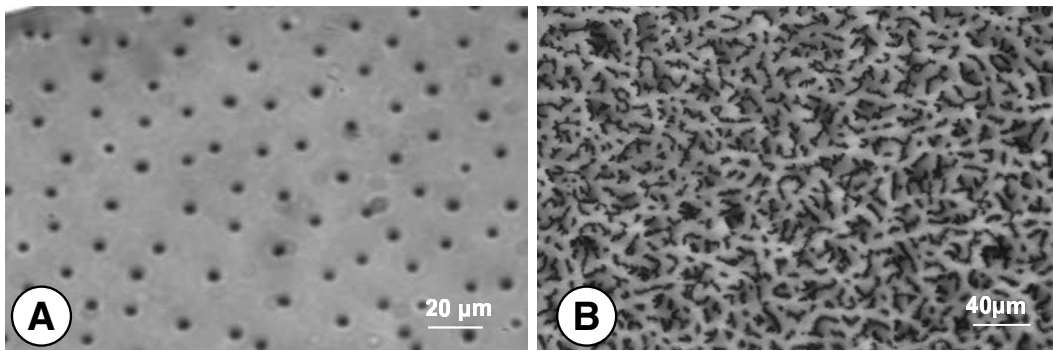


FIG. 4.22 – Variation de la fraction volumique (ϕ) de particules magnétiques (V2G, ADEMTECH) à hauteur de canal fixe ($100\mu\text{m}$). A : structure réseau, $\phi=5\%$ en volume, B : structure labyrinthe, $\phi=20\%$ en volume.

Mode opératoire On prépare des canaux droits en PDMS de différentes hauteurs (Annexe 7) : $200\mu\text{m}$, $250\mu\text{m}$, $300\mu\text{m}$, $350\mu\text{m}$, $400\mu\text{m}$ et $500\mu\text{m}$. Une solution de poly-L-lysine (Sigma, P8920) diluée 10 fois dans de l’eau milliQ est incubée 5 minutes dans les canaux. Après rinçage, les canaux sont séchés à température ambiante toute une nuit. Les particules magnétiques (phase continue : solution de PAA 0.1 % en masse et de NP10 0.1 % en masse) sont ensuite introduites dans un canal recouvert de poly-L-lysine. L’ensemble est ensuite placé au coeur de la bobine posée sur la platine du microscope. On applique un champ de 25 mT pendant 5–10 min. Un flux hydrodynamique ($15\text{--}20\mu\text{m.s}^{-1}$) est alors appliqué avec un pousse-seringue. On observe si les colonnes sont ou non emportées par le flux. On opère ainsi pour chaque hauteur de canal, en faisant varier la quantité

de particules magnétiques.

Observations Nous avons réussi à trouver des couples (concentrations de billes/hauteur de canal) pour lesquels les colonnes sont bien ancrées. Lorsque l'on applique un flux hydrodynamique, les colonnes se plient plus ou moins en fonction de l'intensité du flux (Fig.4.23). Des colonnes bien ancrées résistent à des flux de l'ordre de $250 \mu\text{m.s}^{-1}$. Dans ces conditions extrêmes de flux, les chaînes s'emmêlent et/ou s'accrochent irréversiblement.

Les colonnes n'étant pas toutes identiques (largeur, hauteur), certaines partent parfois dans l'écoulement.

Conclusion Nous avons arrêté notre choix sur le réseau obtenu dans un canal de **350 μm** de haut avec une concentration de particules magnétiques de **0.7 %** en volume.

Tests – qui suggèrent que c'est bien le PAA qui permet d'ancrer les colonnes :

1. Si on laisse incuber une solution de PAA 0,1 % en masse, NP10 0,1 % en masse 15 min avant d'ajouter les particules (phase continue : PAA 0,1 % en masse, NP10 0,1 % en masse) alors les colonnes s'accrochent ;
2. Si on change la phase continue de la suspension de particules (PAA 0,1 % en masse, NP10 0,1 % en masse) et qu'on la remplace par une solution de NP10 0,1 % en masse, l'accrochage est moins bon ;
– et qu'il y a bien une force minimale nécessaire à l'accrochage :
3. Si on dilue la suspension de particules de façon à avoir des colonnes moins épaisses, l'accrochage est quasi-inexistant et si on crée alors un gradient de champ (vertical, vers le bas) à l'aide d'un aimant, les colonnes s'ancrent.

4.5.3 Fonctionnalisation

Nous avons montré au Chapitre 2 qu'il est possible de fonctionnaliser avec des IgG des filaments irréversibles. Pour cela nous utilisons les fonctions COOH portées par le PAA adsorbé sur les particules.

Il est extrêmement compliqué de quantifier les protéines greffées à l'intérieur du canal. La solution la plus pratique serait d'avoir recours à des marqueurs radioactifs, ce pour quoi notre laboratoire n'est pas équipé.

Nous avons donc choisi d'effectuer toute l'étude du greffage en volume : nous avons fabriqué des filaments permanents que nous avons ensuite greffés puis caractérisés, le tout dans des tubes Eppendorf¹⁸. Nous faisons l'hypothèse grossière

¹⁸Les détails concernant le greffage et la caractérisation de filaments magnétiques sont présentés en Annexe 3. Ce travail a été effectué par Florence Thivilliers et Isabelle Génois (Laboratoire LCMD, ESPCI, Paris).

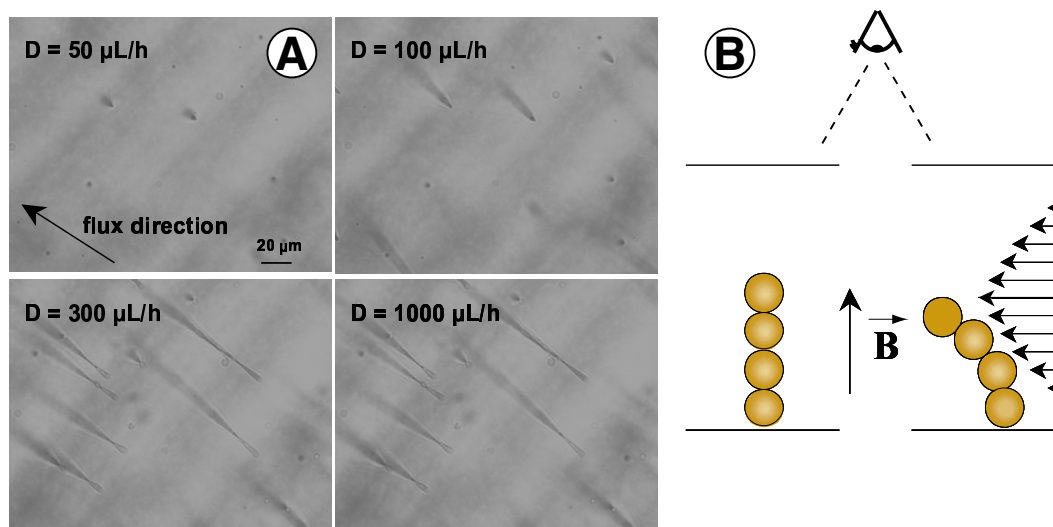


FIG. 4.23 – A : résistance des colonnes à différents flux. Plus le flux est grand plus les colonnes se plient. B : schéma d'une colonne soumise à un flux. Les colonnes sont constituées de particules magnétiques (V2G, ADEMTECH) recouvertes de PAA ($250\,000\text{ g.mol}^{-1}$). Elles sont organisées dans un canal de $500\text{ }\mu\text{m}$ de haut et de 3 mm de large.

que le greffage sur les filaments dans le canal est identique à celui sur des filaments en volume.

Nous sommes en train de transférer les protocoles de greffages établis en volume, au greffage en canal. Le premier greffage effectué montre qu'il est possible de greffer en canal (Fig.4.24). Pour cela, les réactifs nécessaires au greffage sont introduits les uns après les autres, à l'aide du pousse-seringue, une fois le réseau irréversible réalisé.

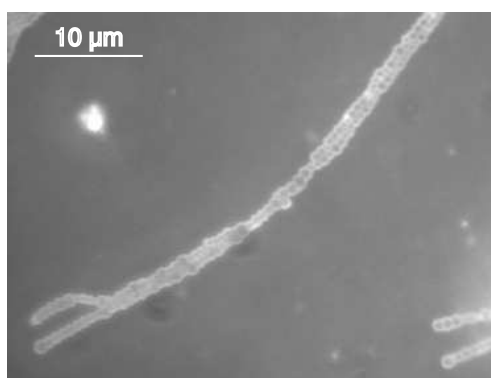


FIG. 4.24 – Colonnes irréversibles constituées de particules magnétiques (V2G, ADEMTECH) recouvertes de PAA ($250\,000\text{ g.mol}^{-1}$) et greffées avec un IgG de souris (UCHT1, anti-CD3 IgG). Les chaînes sont marquées avec un IgG anti-souris Alexa 488 (fluorophore). Greffage effectué dans un canal. Cliché C.G.

4.6 Premières migrations

Avant d'essayer de fonctionnaliser les colonnes dans le canal, nous devons vérifier qu'il est bien adapté au passage des cellules.

Mode opératoire Une fois le réseau construit, des lymphocytes T (lignée Jurkat) sont introduits dans le canal.

Les cellules sont prélevées de leur milieu de culture puis placées dans un tampon PBS (pH=7.4) à une concentration de 10^4 cellules/mL. La concentration des cellules est faible afin de pouvoir observer facilement leur mouvement à l'intérieur du réseau.

Le débit imposé par le pousse-seringue est réglé de sorte que les cellules explorent lentement le réseau. Les cellules migrent alors à une vitesse de $\approx 14 \mu\text{m/s}$.

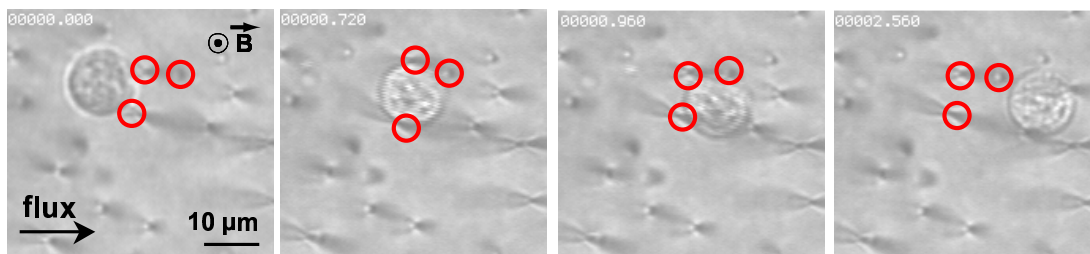


FIG. 4.25 – Migration d'un lymphocyte T (lignée Jurkat) à travers un réseau irréversible ancré. Particules magnétique V2G (ADEMTECH). Le réseau n'est pas fonctionnalisé. Les cercles indiquent les positions des colonnes, afin de visualiser la déformation du réseau au passage de la cellule.

Observations Le réseau se *déforme* et *résiste* au passage des cellules (Fig.4.25). Celles-ci se faufilent à travers cette forêt de filaments flexibles qui s'écartent sur leur chemin. Le pas du réseau est tel que les cellules frottent contre les colonnes.

Certaines cellules s'accrochent aux colonnes. Ces interactions attractives non-spécifiques sont compréhensibles car rien n'a été fait¹⁹ pour les minimiser.

Dans son mouvement, la cellule entraîne la colonne qui se plie de plus en plus dans le sens du flux. Quand la colonne est arrivée à son extension maximale, la cellule se détache (Fig.4.26).

Sous réserve que le système soit formulé de sorte que les interactions non-spécifiques soient moins fortes que les interactions spécifiques, ceci montre que le *flux hydrodynamique est un moyen possible de discriminer ces deux types d'interactions* et donc d'augmenter la sensibilité de la capture.

¹⁹Comme par exemple l'ajout de BSA.

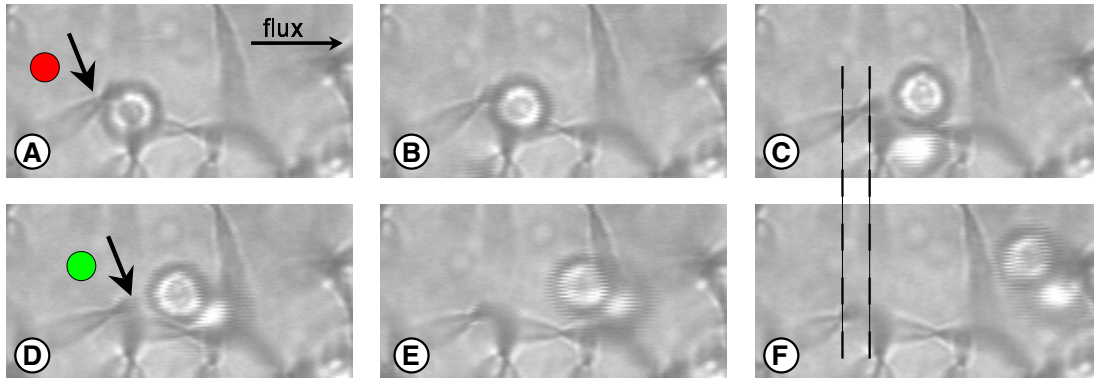


FIG. 4.26 – A, B, C : lymphocyte T (lignée Jurkat) attaché de façon non-spécifique sur des colonnes non fonctionnalisées (point rouge). Dans son mouvement, la cellule fait se courber la colonne sur laquelle elle est accrochée. D : quand la colonne est arrivée à son extension maximale, la cellule, entraînée par le flux hydrodynamique, se détache (point vert). E, F : la colonne revient à sa position d'équilibre. Les traits verticaux permettent de visualiser le déplacement de la colonne.

4.7 Conclusions et perspectives

Nous avons développé un protocole simple, *en une étape*, pour réaliser un réseau irréversible ancré, adapté au tri cellulaire en microcanaux. Son obtention repose sur la combinaison des propriétés d'*auto-assemblage* des particules sous champ et sur le *collage magnéto-stimulé*. Ainsi, lorsque les particules sont introduites dans un canal et soumises à un champ magnétique, elles s'auto-organisent en un réseau de colonnes régulièrement espacées tout en formant des colonnes irréversibles qui s'ancrent sous leur propre poids. Il faut ensuite fonctionnaliser ce réseau avec des anticorps adéquats.

Les cellules migrent, grâce à un flux hydrodynamique, à travers ce réseau de filaments flexibles qui se déforment sous leur passage. Le flux hydrodynamique peut être un moyen de discriminer les interactions spécifiques des non-spécifiques [Goubault et al., 2003b].

Les ingrédients sont donc réunis pour aboutir à un tri cellulaire très sélectif et non-invasif pour les cellules.

Le réseau *irréversible ancré* est solide et adapté au tri cellulaire mais il demande un certain savoir-faire (collage magnéto-stimulé) et sa réalisation prend du temps (étape de greffage in-situ).

Le réseau *réversible ancré*²⁰, qui est en cours de développement, est plus

²⁰Seule la première particule de la colonne est attachée à la paroi inférieure du canal. Les particules sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques avant d'être introduites dans le canal.

facile et plus *rapide* à réaliser. Toutefois, sa résistance au passage des cellules est encore inconnue : une cellule capturée par une colonne réversible ne peut-elle désolidariser la/les particules sur la(les)quelle(s) elle s'est liée du reste de la colonne ? Pour l'instant, on sait que le réseau résiste à des flux de $40\mu\text{m.s}^{-1}$, inférieurs à ceux tolérés par le réseau irréversible ($250\mu\text{m.s}^{-1}$), mais néanmoins suffisants pour nous permettre de travailler.

Le réseau *réversible* serait le plus approprié lorsqu'il est nécessaire de faire appel à un *tri multicritères*. C'est par exemple le cas de la recherche des micrométastases de cancer du sein dans les prélèvements de moelle pour laquelle les cellules cancéreuses sont sélectionnées par le marqueur de surface épithélial EPCAM. Des études détaillées menées par Nathalie Blin (Institut Curie, UMR 144) ont mis en évidence une contamination comprise entre 1 et 70% selon les cas, par des cellules non cancéreuses exprimant également EPCAM. Il faut donc éliminer ces cellules contaminantes par un second tri "négatif", utilisant un marqueur non exprimé par les cellules cancéreuses (par exemple CD45, marqueur spécifique des cellules hématopoïétiques). Avec le réseau réversible, la suppression du champ magnétique permet de déstructurer le système de colonnes, de libérer ainsi les cellules capturées (elles ne portent que quelques particules), et de les rendre disponibles pour une seconde phase de tri sur un autre critère. La difficulté réside dans le maintien du caractère réversible du réseau malgré la mise en présence de milieux biologique et l'utilisation restreinte (en nature et quantité) de tensio-actifs.

A l'image des chambres à flux utilisées par P. Bongrand et ses collaborateurs [Perret et al., 2002], nous souhaitons également faire de ces matrices originales un outil d'étude des interactions ligands/récepteurs en analysant les phénomènes au niveau matrice/cellule (attachement/détachement, en terme de forces ou de vitesses...).

Afin de compléter et finaliser le travail présenté ici, il reste à mettre au point un système de détection qualitatif et quantitatif. Ceci permettra alors d'explorer l'influence et d'optimiser les paramètres tels que le débit du liquide dans la veine, la concentration en cellules et le pas du réseau. Dans l'optique de développer un laboratoire sur puce, il faudra aussi intégrer une stratégie de récupération des cellules immobilisées, afin qu'elles puissent subir un deuxième tri ou des opérations ultérieures de biologie moléculaire.

Bibliographie

- [Austin, 2001] Austin, R. (2001). Fractionating cells. *Physics of biomolecules and cells-Les Houches-EDP Sciences-Springer*, 1 :392.
- [Becker et al., 1995] Becker, F., Wang, X.-B., Huang, Y., Pethig, R., Vykoukal, J., and Gascoyne, P. (1995). Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92 :860.
- [Braun et al., 2000] Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kente-nich, C., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G., and Schlimok, G. (2000). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with breast cancer. *NEJM*, 342(8) :525.
- [Chalmers et al., 1998] Chalmers, J., Zborowski, Sun, L., and Moore, L. (1998). Flow through immunomagnetic cell separation. *Biotechnol.*, 14 :141.
- [Chang et al., 2002] Chang, W., Liepmann, D., and Lee, L. (2002). A biomimetic method for extracting leukocytes from blood in microfluidic devices. *Microtech-nologies in Medicine and Biology. Conference IEEE-EMBS*, Poster 253.
- [Chen and Pépin, 2001] Chen, Y. and Pépin, A. (2001). Nanofabrication : Conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis*, 22(2) :187.
- [Chou et al., 1999] Chou, H.-P., Spence, C., Fu, A., Scherer, A., and Quake, S. (1999). Disposable microdevice for DNA analysis and cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96 :11.
- [Chronis et al., 2001] Chronis, N., Lam, W., and Lee, L. (2001). A microfabir-cated bio-magnetic separator based on continious hydrodynmic parallel flow. *MicroTAS 2001, J.M. Ramsey and van der Berg, A. Eds, Kluwer Acad. Pub*, 1 :497.
- [de Wynter et al., 1995] de Wynter, E. W., Coutinho, L. H., Pei, X., Marsh, J. C. W., Hows, J., Luft, T., and Testa, N. G. (1995). Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood using five separation systems. *Stem Cells*, 13 :524.
- [Decher, 1997] Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies : toward layered poly-meric multicomposites. *Science*, 277 :1232.
- [Dittrich and Schwille, 2003] Dittrich, P. and Schwille, P. (2003). An integra-ted microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection and sorting of fluorescent cells and particles. *Anal. Chem.*, 75 :5767.

- [Doyle et al., 2002a] Doyle, P., Bibette, J., Bancaud, A., and Viovy, J.-L. (2002a). Self-assembled magnetic matrices for DNA separation chips. *Science*, 295 :2237.
- [Doyle et al., 2002b] Doyle, P., Fütterer, C., Minc, N., Goubault, C., Viovy, J.-L., and Bibette, J. (2002b). Self-Assembled Magnetic Colloids for DNA Separations in microfluidics devices. *MicroTAS 2002*, Ed. Baba, Y., Shoji, S. and van den Berg, A., 2.
- [Duke and Austin, 1997] Duke, T. and Austin, R. (1997). Microchips for sorting DNA. *Physics of biological systems*, Springer, page 18.
- [Duke and Austin, 1998] Duke, T. and Austin, R. (1998). Microfabricated Sieve for the Continuous Sorting of Macromolecules. *Phys. Rev. Lett.*, 80 :1552.
- [Fiedler et al., 1998] Fiedler, S., Shirley, S., Schnelle, T., and Fuhr, G. (1998). Dielectrophoretic sorting of particles and cells in microsystem. *Anal. Chem.*, 70(9) :1909.
- [Frénéa et al., 2002] Frénéa, M., Melaine, N., Le Piouffle, B., Tixier, A., and Fujita, H. (2002). A multilayer microelectrode array for particle separation by dielectrophoresis. *MicroTAS 2002*, Ed. Baba, Y., Shoji, S. and van den Berg, A., 1 :578.
- [Fu et al., 2002] Fu, A., Chou, H.-P., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F., and Quake, S. (2002). An integrated microfabricated cell sorter. *Anal. Chem.*, 74(11) :2451.
- [Fuchs et al., 2003] Fuchs, A., Manaresi, N., Freida, D., Altomare, L., Villiers, C., Medoro, G., Romani, A., Chartier, I., Bory, C., Tartagni, M., Marche, P., Chatelain, F., and Guerrieri, R. (2003). A microelectronic chip opens new fields in rare cell population analysis and individual cell biology. *MicroTAS 2003*, Ed. Northrup, M.A., Jensen, K.F. and Harisson D.J., 2 :911.
- [Furdui and Harrison, 2002] Furdui, V. and Harrison, D. (2002). The influence of flow channel geometry on capture efficiency of rare cells using protein A-anti human CD3 magnetic beads . *MicroTAS 2002*, Ed. Baba, Y., Shoji, S. and van den Berg, A., 2 :700.
- [Goubault et al., 2003a] Goubault, C., Jop, P., Fermigier, M., Baudry, J., Bertrand, E., and Bibette, J. (2003a). Flexible magnetic filaments as micromechanical sensors. *Phys. Rev. Lett.*, 91 (26) :260802.
- [Goubault et al., 2002] Goubault, C., Viovy, J.-L., and Bibette, J. (2002). Self-assembled magnetic beads for cells sorting. *MicroTAS 2002*, Ed. Baba, Y., Shoji, S. and van den Berg, A., 2 :844.
- [Goubault et al., 2003b] Goubault, C., Viovy, J.-L., and Bibette, J. (2003b). Capture of rare cells by magnetic filaments. *MicroTAS 2003*, M. A. Northrup al. Eds, Transducers Research Foundation Pub., 1 :239.
- [Haik et al., 1999] Haik, Y., Pai, V., and Chen, C.-J. (1999). Development of magnetic device for cell separation. *J. Magn. Magn. Mater.*, 194 :254.

- [Haukanes and Kvam, 1993] Haukanes, B. and Kvam, C. (1993). Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology*, 11 :60.
- [Hong and Quake, 2003] Hong, J. and Quake, S. (2003). Integrated nanoliter systems. *Nature Biotech.*, 21 :1179.
- [Huang et al., 2002] Huang, Y., Joo, S., Duhon, M., Heller, M., Wallace, B., and Xu, X. (2002). Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays. *Anal. Chem.*, 74 :3363.
- [Ikeuchi and Washizu, 2003] Ikeuchi, M. and Washizu, M. (2003). Polymer synthesizer on magnetic transport of particles. *MicroTAS 2003, Ed. A. Northrup, K.F. Jensen and D.J. Harrison*, 1 :251.
- [Jacobson and Ramsey, 1999] Jacobson, S. and Ramsey, J. (1999). Elektrokinetic focusing in microfabricated channel structures. *Anal. Chem.*, 69 :3212.
- [Kaji et al., 2003] Kaji, N., Takamura, Y., Horiike, Y., Nakanishi, H., Nishimoto, T., and Baba, Y. (2003). Fats separation of large DNA by nanopillar chip. *MicroTAS 2003, Ed. A. Northrup, K.F. Jensen and D.J. Harrison*, 2 :1315.
- [Karumanchi et al., 2002] Karumanchi, R., Doddamane, S., Sampangi, C., and Todd, P. (2002). Field-assisted extraction of cells, particles and macromolecules. *TRENDS in biotechnology*, 20(2) :72.
- [Lawrence et al., 1994] Lawrence, E., Ivey, M., Flores, G., Liu, J., Bibette, J., and Richard, J. (1994). Field-induced structures of confined ferrofluid emulsions. *Int. J. Mod. Phys. B*, 8(20-21) :2765.
- [Lee et al., 2003] Lee, G.-B., Fu, L.-M., Yang, R., and Pan, Y.-J. (2003). Micro flow cytometers using electrokinetic forces with integrated optical fibers for on-line cell/particle counting and sorting. *microTAS 2003, Ed. Northrup, M.A. and Jensen, K.F. and Harrison, D.J.*, 1 :45.
- [Lee et al., 2001] Lee, G.-B., Hung, C., Ke, B., Huang, G., Hwei, B., and Lai, H.-F. (2001). Hydrodynamic focusing for a micromachined flow cytometer . *ASME J. Fluids Eng.*, 123 :672.
- [Liotta, 2001] Liotta, L. (2001). Cancer : an attractive force in metastasis . *Nature*, 410 :24.
- [Liu et al., 1995] Liu, J., Lawrence, M., Wu, A., Ivey, M., Flores, G., Javier, K., Bibette, J., and Richard, J. (1995). Field-induced structures in ferrofluid emulsions. *Phys. Rev. Lett.*, 74(14) :2828.
- [McCloskey et al., 2000] McCloskey, K., Chalmers, J., and Zborowski, M. (2000). Magnetophoretic mobilities correlate to antibody binding capacities. *Cytometry*, 40 :307.
- [McCloskey et al., 2003] McCloskey, K., Moore, L., Hoyos, M., Rodriguez, A., Chalmers, J., and Zborowski, M. (2003). Magnetophoretic cell sorting is a function of antibody binding capacity. *Biotechnol. Prog.*, 19 :899.

- [McCloskey et al., 2001] McCloskey, K., Zborowski, M., and Chalmers, J. (2001). Measurement of CD2 expression levels of IFN- α -treated fibrosarcomas using cell tracking velocimetry. *Cytometry*, 44 :137.
- [Merkel et al., 1999] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :50.
- [Minc et al., 2004] Minc, N., Fütterer, C., Dorfman, K., Bancaud, A., Gosse, C., Goubault, C., and Viovy, J.-L. (2004). Rapid and reproducible microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrices. *accepté à Anal. Chem.*
- [Nakamura et al., 2001] Nakamura, M., Decker, K., Chosy, J., Comella, K., Melnik, K., Moore, L., Lasky, L., Zborowski, M., and Chalmers, J. (2001). Separation of a breast cancer cell line from human blood using a quadrupole magnetic flow sorter. *Biotechnol. Prog.*, 17(6) :1145.
- [Patel, 2001] Patel, D. (2001). *Separating cells*. Springer.
- [Perret et al., 2002] Perret, E., Benoliel, A., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J., Bongrand, P., and Feracci, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO*, 21(11) :2537.
- [Philip et al., 1997] Philip, J., Mondain-Monval, O., Leal-Calderon, F., and Biette, J. (1997). Colloidal force measurements in the presence of a polyelectrolyte. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 30 :2798.
- [Rida et al., 2003] Rida, A., Lehnert, T., and Gijs, M. (2003). Microfluidic mixer using magnetic beads. *MicroTAS 2003, Ed. A. Northrup, K.F. Jensen and D.J. Harrison*, 1 :579.
- [Roath et al., 1990] Roath, S., Smith, A., and Watson, J. (1990). High-gradient magnetic separation in blood and bone marrow processing. *J. Magn. Magn. Mater.*, 85 :285.
- [Rong et al., 2003] Rong, R., Choi, J., and Ahn, C. (2003). A novel magnetic chaotic mixer for in-flow mixing of magnetic beads. *MicroTAS 2003, Ed. A. Northrup, K.F. Jensen and D.J. Harrison*, 1 :335.
- [Ryu et al., 2003] Ryu, K., Shaikh, K., and Liu, C. (2003). Micro magnetic stir-bars integrated in parylene surface-micromachined channels for mixing and pumping. *MicroTAS 2003, Ed. A. Northrup, K.F. Jensen and D.J. Harrison*, 1 :635.
- [Sarda et al., 2004] Sarda, S., Pointu, D., Pincet, F., and Henry, N. (2004). Specific recognition of macroscopic objects by the cell surface : evidence for a receptor density threshold revealed by micrometric particles binding characteristics. *soumis à Biophys. J.*
- [Tibbe et al., 2001] Tibbe, A., de Grooth, B., Liberti, P., and Terstappen, L. (2001). Cell analysis system based immunomagnetic cell selection and align-

- ment followed by immunofluorescent analysis using compact disk technologies. *Cytometry*, 43 :31.
- [Tsuda et al., 2002] Tsuda, J., Tada, Y., Hasiguchi, G., Hirano, K., Kaji, N., and Baba, Y. (2002). A new fabrication technique of DNA electrophoresis chip by silicon micromachining technology. *MicroTAS 2002*, Ed. Y. Baba, S. Shoji, A. van den Berg, 1 :109.
- [Vona et al., 2002] Vona, G., Bérout, C., Benachi, A., Quenette, A., Bonnefont, J., Romana, S., Munnich, A., Vekemans, M., Dumez, Y., Lacour, B., and Paterlini-Bréchet, P. (2002). Enrichment, immunomorphological and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am. J. Pathol.*, 160(1) :51.
- [Vona et al., 2000] Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schütze, K., Capron, F., Franco, F., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., Bréchet, C., and Paterlini-Bréchet, P. (2000). Isolation by size of epithelial tumor cells. *Am. J. Pathol.*, 156(1) :57.
- [Wang et al., 2000] Wang, X.-B., Huang, Y., Vykoukal, J., Becker, F., and Gascoyne, P. (2000). Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Anal. Chem.*, 72(4) :833.
- [Wolf et al., 2000] Wolf, A., Larsen, U., Friis, P., and Telleman, P. (2000). Chip-integrated microfluidic system for cell sorting and cell culturing. *BiosensorsII*, page 235.
- [Xu et al., 1999] Xu, C., Wang, Y., Cao, M., and Lu, Z. (1999). Dielectrophoresis of human red cells in microchips. *Electrophoresis*, 20 :1829.
- [Zborowski et al., 2003] Zborowski, M., Ostera, G., Moore, L. and Milliron, S., J.J., C., and Schechter, A. (2003). Red blood cell magnetophoresis. *Biophys. J.*, 84 :2638.
- [Zborowski et al., 1999] Zborowski, M., Sun, L., Moore, L., Williams, P., and Chalmers, J. (1999). Continuous cell separation using novel magnetic quadrupole flow sorter. *J. Magn. Magn. Mater.*, 194 :224.

Conclusions et perspectives

Ce mémoire explore les applications biologiques des auto-assemblages, sous champ magnétique, de particules magnétiques.

Partant des notions clefs de formulation, de stabilité colloïdale et de magnétisme, un état de l'art des latex magnétiques est effectué au Chapitre 1. Il met en lumière le caractère fortement pluridisciplinaire de ces objets, ainsi que les difficultés inhérentes à leur conception et utilisation. Une revue des principales applications (biomédicales, biotechnologiques, biophysiques et microfluidiques) y est aussi proposée.

Le Chapitre 2 est consacré à la confection de nouveaux matériaux : les filaments magnétiques. Ces objets linéaires sont constitués de particules magnétiques reliées entre elles par des molécules-liens. Un collage, dit «magnéto-stimulé», a été, pour cela, développé. Il requiert la parfaite maîtrise de la stabilité colloïdale ainsi que de l'organisation sous champ des particules. Les liens utilisés sont un polymère ou une protéine adsorbé, de même qu'un sandwich anticorps / antigène / anticorps. Il est ensuite possible d'obtenir des filaments plus complexes, décorés à façon, avec des anticorps, des molécules d'ADN ou des enzymes.

Ces filaments constituent un nouvel outil pour mesurer, de manière «simple», la rigidité de flexion de ces molécules ou complexes-liens. Au Chapitre 3 est détaillée la méthode expérimentale, qui repose sur la métastabilité sous champ de ces filaments flexibles (ils se plient sous forme d'épingles à cheveux), ainsi que le modèle permettant d'extraire la rigidité de courbure de la mesure de la courbure de l'épingle en fonction du champ par microscopie optique, combinée à celle de la longueur du lien par diffusion de la lumière.

Auto-organisés sous forme de réseau, dans un canal microfluidique, ces filaments composent une matrice dédiée à la séparation de cellules. Le Chapitre 4 expose la fabrication in situ de cette matrice, son ancrage à la paroi ainsi que sa fonctionnalisation avec des anticorps. La faisabilité de cette chromatographie de cellules a été établie. Ceci constitue un système original, bien adapté à la réalisation de laboratoires sur puces.

En annexes, sont présentés les protocoles et tests réalisés au cours de cette étude.

Ces filaments flexibles constituent un nouveau type de matériau prometteur. Leur flexibilité permet de sonder la flexibilité à l'échelle moléculaire. Leur or-

ganisation en réseau offre une matrice simple et originale pour la séparation de cellules. Ces deux champs ont été ici entrouverts. De nombreuses études, en cours, vont, il faut espérer, faire ressortir les apports nouveaux de ces objets, tant au plan fondamental qu'au niveau des applications biomédicales.

Dans le futur, nous souhaitons utiliser les filaments flexibles pour étudier le complexe actine/myosine en action (avec/sans ATP). En effet, les propriétés mécaniques de filaments d'actine isolés ont été étudiées, et la régulation de la flexibilité par fixation de protéines telles la tropomyosine a été abordée dans la littérature. On sait aussi que la fixation de la myosine semble rendre les filaments plus flexibles, mais aucune étude des propriétés mécaniques du complexe actine/myosine en action n'a été entreprise. On pourra ainsi vraisemblablement savoir si l'actine change de structure lors de la contraction musculaire.

Par ailleurs, la matrice de filaments magnétiques fonctionnalisés avec des anticorps pourra permettre de développer un micro-système intégré pour la recherche de cellules rares et l'analyse de leur transcriptôme à des fins de diagnostic, ciblé sur le cancer. La précocité du diagnostic est un point essentiel, qui impose un seuil de détection de quelques cellules. Analyser le transcriptome de ces cellules métastasées constitue un enjeu majeur : compte-tenu de l'hétérogénéité des cancers et de leur résistance aux traitements, il constitue le principal espoir pour personnaliser et améliorer les stratégies thérapeutiques.

Nous n'avons pas exploité les chaînes décorées avec des ADN ou des enzymes. Toutefois, une des perspectives d'application est d'utiliser des chaînes, décorées avec des oligonucléotides, pour construire des puces à ADN²¹. Un grand nombre de sites de reconnaissance sont ainsi déposés sur une lame, ce qui permet d'effectuer de nombreuses analyses en un temps limité avec une faible quantité d'échantillons (contenant les ADN-cibles).

Toutefois les puces actuelles présentent :

- une sensibilité qui reste insuffisante pour certaines applications ;

²¹Ces types de puces consistent en des sondes (ADN ou oligonucléotides) déposées ou synthétisées *in situ* en des spots d'une centaine de microns carrés sur une surface (www.affymetrix.com).

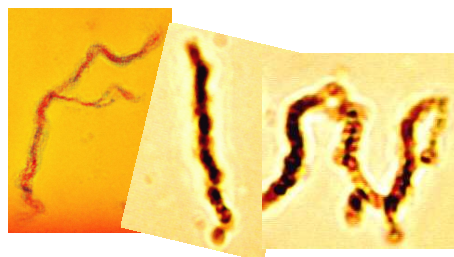
- une cinétique d'hybridation lente (comparée à l'hybridation en solution).

On peut penser fabriquer différents lots de chaînes recouvertes d'ADN selon la méthode présentée ci-dessus. Cette méthode s'inspire des méthodes de fabrication de puces traditionnelles pour lesquelles les ADN sont immobilisés sur des lames recouvertes de poly-L-lysine (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>). Les chaînes seraient ensuite «*spotées*» sous champ magnétique afin de les organiser sous forme de brosse.

Les avantages d'une telle «*puce magnétique*» seraient :

- une plus grande surface spécifique : avec des particules de 200 nm et des brosses d'une dizaine de microns de long, un gain de surface d'un facteur 10 à 100 est susceptible d'augmenter d'autant la sensibilité et la cinétique.
- une utilisation bien plus complète des ADN-cibles contenus dans les échantillons à hybrider : la dimension des brosses et celle des cellules d'hybridation peut être adaptée afin que toute cible soit située à moins de quelques microns d'une sonde.
- une accélération de la cinétique d'hybridation : au cours de l'hybridation, l'emploi d'un champ magnétique oscillant permettrait d'étendre au maximum la «*brosse*» au sein de la solution contenant les ADN-cibles tout en créant une agitation locale susceptible de diminuer les temps de diffusion et de stimuler un plus grand nombre de conformations des ADN-sondes.

Enfin, les chaînes décorées avec de la trypsine peuvent être insérées dans un canal microfluidique afin d'effectuer l'analyse de protéines sur puce : avant d'être analysées par spectrographie de masse, les protéines sont digérées au préalable c'est-à-dire que l'on utilise une enzyme (généralement la trypsine) qui coupe les protéines en de petits fragments. L'immobilisation de trypsine sur des particules magnétiques permet (i) de la retirer du mélange réactionnel, (ii) de la réutiliser (iii) d'améliorer sa stabilité au stockage (fixée, elle ne peut plus s'auto-digérer). Des chaînes magnétiques peuvent être récupérées très rapidement par centrifugation ou capture magnétique. Insérées dans les canaux d'un laboratoire sur puce, elles peuvent servir de matrice à travers laquelle les protéines sont digérées avant d'être analysées.



ANNEXES

Annexe 1 : Fabrication de chaînes permanentes – Matériel et méthodes

Les produits

Les **particules magnétiques** nous sont fournies par la société ADEMTECH (lot *V2G*, $\phi \simeq 5\%$ vol). Ce sont des émulsions magnétiques ayant subi un traitement thermique afin d'augmenter la quantité d'oxyde. Il ne reste pratiquement plus d'octane. Elles n'ont pas subi d'étapes de polymérisation. Elles sont stabilisées par un tensio-actif non ionique, le Triton X405, à 2.1 g.L^{-1} . On peut considérer que leur interface est constituée de Triton X405, d'acide oléique (tensio-actif qui stabilise l'oxyde de fer) et d'oxyde de fer. Leur diamètre est de $0.75 \mu\text{m}$. Les émulsions magnétiques sont conservées à 4°C et doivent être impérativement homogénéisées avant utilisation.

Les **tensio-actifs** utilisés sont :

- le *Triton X405* $[(\text{CH}_3)_3\text{-C-CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-H avec } n \simeq 40]$ CMC²² : 0.81 mM ; (Sigma, [X405])
- le Nonyl Phenol Ethoxylate ou *NP10* $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{10}\text{-H}$ (Sigma Aldrich, [NP-10]) ; CMC = $7.10^{-5} \text{ M} = 4.10^{-3} \%$ en masse.
- le poly(oxyethylene)sorbitan monolaurate ou *Tween 20* , CMC : 0.08 mM ; (Sigma ; [P-7949]).

Les **polymères** utilisés sont :

- le poly(acide acrylique) ou PAA $([-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CO}_2\text{H})-])_n$ ($M_W/M_N = 1.1$) sous forme d'une solution à 35% en masse. Sa masse molaire est de $M_W = 250 \text{ kg.mol}^{-1}$ et son rayon de giration en bon solvant est de 35 nm . Son pK_A est estimé à 6.28 ; Pour le système eau/PAA la température θ est de 20°C . (Aldrich [41,600-2]). Aux pH où nous travaillons ($3 < \text{pH} < 5$), il est faiblement chargé.

²²Concentration Micellaire Critique

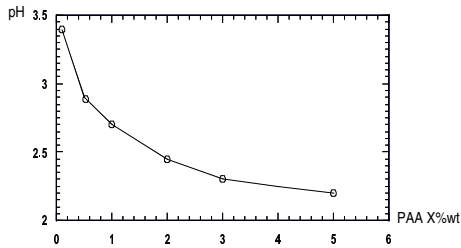
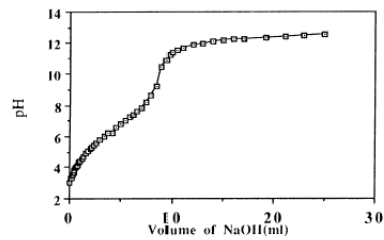


FIG. 27 – Variation du pH en fonction de la concentration en PAA. Courbe CG

FIG. 28 – Variation du pH d'une solution de PAA 0.1% en masse en fonction de la concentration en soude. Extrait de J. Philip *et al.*, J. Phys. D, 30, 2798 (1997).



- la poly-L-lysine $[-NH-CH((CH_2)_4-NH_3^+)-CO-]_n$. C'est un mélange de différentes longueurs de chaînes : $M_W = 70\,000 - 150\,000$ g/mol. Elle est vendue sous forme d'une solution aqueuse à 0.1% w/v ; (Sigma, [P8920]). Poly-L-lysine-FITC labeled : $M_W = 30\,000 - 70\,000$ g/mol, 0.006 moles de FITC par moles de monomères lysine (Sigma, [P3069])
- le poly(diméthylacrylamide) ou PDMA ($M_W/M_N \sim 1.8$). Ce polymère est synthétisé à l'Institut Curie par V. Barbier [Madadhushi, R.S., *Electrophoresis*, **19**, 224 (1998)], [Barbier V., Thèse de doctorat Paris 6, 2002]. Sa masse moléculaire est de 10^6 g.mol⁻¹. Il est stocké à 4°C sous la forme d'une solution à 3% en masse. Pour éviter les flux électro-osmotiques en électrophorèse, on laisse incuber 40 min une solution de PDMA à 0.15% en masse.

Le **caséinate de sodium** est un mélange de caséine α_s , β et κ (ratios 5 :4 :1). Pour solubiliser le caséinate, on opère de la façon suivante :

- dissolution de la poudre de caséinate dans de l'eau milliQ de sorte à obtenir une solution à 0.1% en masse. On ajoute de l'azidure de sodium (NaN_3) à 0.02% en masse pour éviter toute croissance bactérienne ;
- afin de faciliter l'hydratation du caséinate, la solution est chauffée au bain marie à 60°C pendant une heure, puis soumise aux ultrasons pendant 45 min. Elle est maintenue sous agitation une nuit.

Le pH d'une telle solution est de l'ordre de 6.5. Le caséinate peut être mis en présence du NP10 sans qu'il soit dénaturé [Dalglish, D.G., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2**(6), 573 (1997)].

Les anti-corps

- IgG polyclonal de lapin anti Facteur de von Willebrand humain (Diagnostica Stago) noté anti-vWF IgG. Il est stocké au congélateur par aliquot de 50 μL à 0.4 g/L ;
- vWF Calibrator (Diagnostica Stago, 00520) : plasma humain lyophilisé contenant le facteur von Willebrand. Lyophilisé, il doit être stocké entre 2 et 8°C. Pour le reconstituer, on ajoute 1 mL d’eau milliQ. La concentration est alors de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- IFN- γ : IFN- γ recombinant de souris, (BD Biosciences Pharmingen, ref : 554587, 10 μL à 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ;
- R4-6A2 : monoclonal rat anti-souris IFN- γ IgG₁, (BD Biosciences Pharmingen, ref : 551216, 1 mg) ;
- XMG1.2 monoclonal rat anti-souris IFN- γ IgG₁ (ou R4-6A2), (BD Biosciences Pharmingen, ref : 554409, 0.1 mg) ;

Les ADN :

- ADN- λ : phage lambda (Amersham Biosciences, 27-4118-01)
- ADN courts de type “PhiX 174” (Gibco BRL, ϕX 174 RF DNA/Hae III Fragments)
- YOYO-1 (Molecular Probes, Y-3601) : marqueur fluorescent d’ADN double brin. Sa longueur d’adsorption maximale est : E_{ex} = 491 nm et celle de réémission maximale est : E_{em} = 509 nm. C’est un bis-intercalant qui se fixe de façon quasi-irréversible sur l’ADN. On l’utilise à une concentration d’une molécule de YOYO-1 pour dix paires de bases. Il provoque alors une surextension des ADN d’un facteur de 30%. On ajoute du β -mercapto-éthanol afin de retirer les radicaux de l’oxygène dissous dans la solution responsable du photoblanchiment et de la photoscission.

Dispositif optique

L’**observation** des particules magnétiques se fait en transmission avec un microscope inversé (Zeiss Axiovert 100, Leica). La visualisation se fait avec une caméra CCD (COHU).

Pour observer en fluorescence, on utilise le même microscope équipé d’une source au mercure (HBO 200 W) filtrée à $\lambda = 450 - 490$ nm. On observe l’intensité émise à $\lambda = 510 - 550$ nm. L’objectif utilisé est un x100 à immersion à huile avec une ouverture numérique de 1.4 (Zeiss). La visualisation se fait grâce à une caméra CCD intensifiée (LHESA).

Les images sont enregistrées et traitées avec le logiciel Scion Image.

Manipulation des émulsions

”*Laver une émulsion*” consiste à remplacer sa phase continue par une autre. Dans le cas des émulsions magnétiques, on place l’émulsion devant un aimant et on attend que le surnageant soit limpide. On l’enlève pour le remplacer aussitôt par la phase continue choisie. On répète cette opération 3 fois au minimum pour être sûr d’avoir éliminé complètement l’ancienne phase continue.

L’**obtention de chaînes irréversibles** se fait en mélangeant les billes dans la phase continue adéquate au sein d’un **tube eppendorf**. On place ensuite ce tube dans une bobine qui délivre un champ homogène sur la longueur du tube eppendorf (Fig.29). Le temps d’application et l’intensité du champ magnétique sont précisés dans le texte dans le cadre de chaque expérience. On pipette ensuite les chaînes pour les observer au microscope.

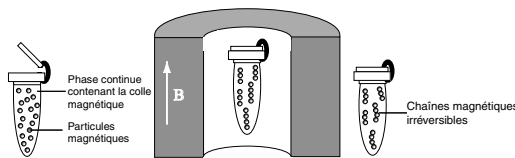


FIG. 29 – Fabrication de chaînes. Les particules magnétiques sont dispersées dans une phase continue adéquate puis le tout est placé au coeur d’une bobine magnétique. Lorsque le champ est annulé, les chaînes persistent.

Cellules d’observation

Si l’action de pipeter endommage les chaînes, on les fabrique dans la cellule d’observation. On utilise alors un **capillaire**. Le capillaire est rempli par capillarité puis posé sur une lamelle de microscope. Il est ensuite scellé sur la lamelle et le tout est placé au coeur de la bobine. Le champ est appliqué perpendiculairement au capillaire.

Les avantages du capillaire sont multiples :

- observation des chaînes sans perturbations liées au transfert sur une lame de microscope ;
- contrôle de la longueur des chaînes : la longueur maximale des chaînes est imposée par la largeur du capillaire, le champ magnétique étant appliqué perpendiculairement au capillaire ;
- contrôle de l’épaisseur des chaînes : quand des particules magnétiques sont placées entre deux plans et qu’un champ magnétique est appliqué perpendiculairement à ces plans alors elles s’auto-organisent en un réseau de colonnes régulièrement espacées [Liu, J. *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **74**(14), 2828 (1995)].

L'épaisseur des colonnes dépend de la concentration en particules : plus il y a de particules, plus les colonnes sont épaisses. En ajustant la quantité de particules, on peut ainsi obtenir des chaînes d'épaisseur une particule.

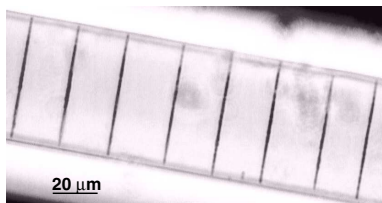


FIG. 30 – Utilisation d'un capillaire : particules magnétiques ($0.75\ \mu\text{m}$ de diamètre) organisées sous champ dans un capillaire de section carrée $50\ \mu\text{m}$. Cliché C.G.

Pour **sceller** les capillaires, on utilise du vernis à ongle, de la cire à cacheter, ou encore une colle qui réticule sous UV. On veille à ce que ces “colles” n'interfèrent pas avec les solutions à observer. Si on utilise des protéines, on ne peut utiliser que la colle qui réticule sous UV (4M21, Epotecny) en ayant pris soin de protéger des UV la solution de protéines. En effet, l'utilisation de cire à cacheter crée un gradient de température qui dénature ou modifie les protéines de même que le solvant contenu dans le vernis.

Annexe 2 : Décoration de chaînes permanentes

Notre but est de fonctionnaliser des chaînes irréversibles avec (i) des IgG, (ii) des enzymes.

Ces chaînes sont constituées de particules magnétiques recouvertes de PAA ($M_W=250\,000\text{ g.mol}^{-1}$) adsorbé. On se sert ensuite des fonctions COOH du PAA pour greffer les protéines. La réaction mise en jeu est couramment utilisée en biochimie et fait intervenir les fonctions carboxyles d'un composé – ici le PAA – et les fonctions amines des protéines pour donner une liaison peptidique (Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press).

Produits

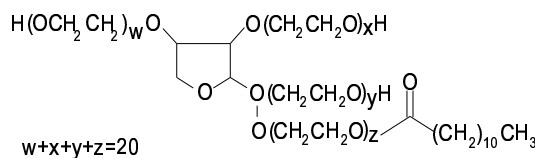
Nous rappelons ici tous les produits utilisés pour la décoration de chaînes permanentes. Cette liste peut être redondante avec celle donnée à l'Annexe 1. Les **particules magnétiques** nous sont fournies par la société ADEMTECH

- *Lot V2G* : Ce sont des émulsions magnétiques ayant subi un traitement thermique afin d'augmenter la quantité d'oxyde. Il ne reste pratiquement plus d'octane. Elles n'ont pas subi d'étapes de polymérisation. Elles sont stabilisées par un tensio-actif non ionique, le Triton X405, à 2.1 g.L^{-1} . Leur concentration est $\phi \simeq 5\%$ en volume.
On peut considérer que leur interface est constituée de Triton X405, d'acide oléique (tensio-actif qui stabilise l'oxyde de fer) et d'oxyde de fer. Leur diamètre est de $0.75\text{ }\mu\text{m}$.
- *Lot 113e* : particules magnétiques fonctionnalisées COOH, diamètre : 290 nm, taux de solide : 5% en masse, conservées dans une solution de triton X405 à 0.21% en masse.

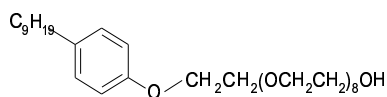
Les émulsions magnétiques sont conservées à 4°C et doivent être impérativement homogénéisées avant utilisation.

Les tensio-actifs :

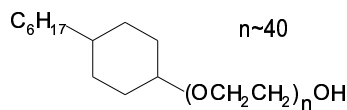
- le *Tween 20* ou Polyoxyethylene sorbitan monolaurate $CMC=8.10^{-5}$ M, $M_W=1228$ g.mol⁻¹, HLB : 16.7 (Aldrich [27,434-8]) ;



- *NP10* ou Nonyl Phenol Ethoxylate. Connu également sous le nom de Tergitol. Sigma Aldrich, [NP-10]) ; $CMC=7.10^{-5}$ M = 4.10^{-3} % en masse, HLB : 13.1 ;



- *Triton X-405* ou polyoxyethylene(40) isooctylcyclohexyl ether, $M_W=564.8$ g.mol⁻¹, $CMC=8.10^{-5}$ M, HLB : 17.9 (Sigma, [X405]) ;



- *Synperonic PE/F127* ou Poloxamer 407, copolymère triblocs : PEO-PPO-PEO soit $HO-(CH_2-CH_2-O)_{106}-(CH_2-CH(CH_3)-O)_{70}-(CH_2-CH_2-O)_{106}-H$, $M_W=12\,600$ g.mol⁻¹, HLB : 18-23 (Uniquema).

Le poly(acide acrylique) ou PAA ($[-CH_2-CH(CO_2H)-]_n$) ($M_W/M_N=1.1$) en solution à 35% en masse, (Aldrich [41,600-2]). Sa masse molaire est de $M_W=250\,000$ g.mol⁻¹ et son rayon de giration en bon solvant est de 35 nm. Son pK_A est estimé à 6. Pour le système eau/PAA, la température θ est de 20°C.

Les anticorps :

- *UCHT1* : IgG₁ de souris gracieusement fourni par C. Hivroz (Institut Curie, INSERM 520). Cet anticorps réagit avec la chaîne ϵ du complexe CD3 des lymphocytes T ;
- IgG polyclonal de lapin anti Facteur de von Willebrand humain (Diagnostics Stago) noté *anti-vWF IgG*. Il est stocké au congélateur (-20 °C) par aliquot de 50 μ L à 0.4 g.L⁻¹ ;
- *goat anti-mouse IgG Alexa 488* : IgG marqué avec le fluorophore Alexa 488 dont le spectre est présenté Fig.31. Il présente l'avantage de pouvoir être utilisé dans une large gamme de pH contrairement à ses homologues (Fig31), (Molecular Probes, [A11001]) ;

- *goat anti-rabbit IgG Alexa 488* (Molecular Probes, [A11008]).

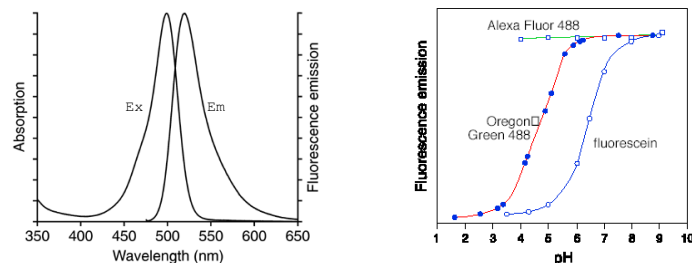


FIG. 31 – Gauche : Spectre d'absorption et d'émission du fluorophore Alexa 488 (Molecular Probes). Droite : Efficacité du fluorophore en fonction du pH. Comparaison avec des fluorophores équivalents (même concentration). L'intensité de fluorescence est mesurée à 490/520 nm (excitation/émission). Données Molecular Probes extraites de <http://www.probes.com/>

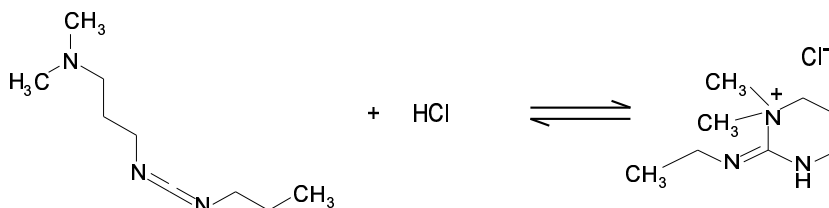
Trypsine bovine ; native ; purifiée par affinité sur p-aminobenzamidine (Sigma, [T8003]).

BAPNA ou N α -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride (Aldrich,[85,711-4]). Substrat utilisé pour quantifier l'activité de la trypsine.

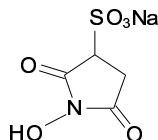
Benzamidine, C₇H₈N₂, inhibiteur de la trypsine : cette molécule se fixe sur le site actif de l'enzyme. Il y a alors formation d'un complexe benzamidine/trypsine. On évite ainsi que la trypsine s'auto-digère. (Fulka,[12072]).

Les réactifs de greffage : réactifs utilisés pour coupler des molécules (l'une portant une fonction COOH, l'autre NH₂), via une liaison peptidique.

- N-(3-Diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide hydrochloride ou EDC, M_W = 191.7 g.mol⁻¹, (Aldrich,[16,146-2])



- N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt ou s-NHS, $M_W = 217.1 \text{ g.mol}^{-1}$, (Fluka,[56485])



Les agents bloquants : ils sont utilisés pour arrêter la réaction de couplage (ie ils réagissent avec les groupements fonctionnels encore activés) et/ou s'adsorbent sur les zones non greffées afin de limiter par la suite les interactions non spécifiques (protéines/cellules-billes).

- Caséine (Casein from bovine milk, Sigma, [C 5890])
- BSA (Bovine Serum Albumin), $M_W = 66 \text{ kDA}$ (Sigma,[A 3059])
- Glycine (Sigma, [G 8898]), $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, $M_W = 75.07 \text{ g.mol}^{-1}$

Les tampons

- Tampon phosphate 10 mM, pH=7.3²³
- Tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, Tween 20 0.2% en masse
- Tampon phosphate 100 mM, pH=7.3, Triton X405 0.3% en masse.

Réaction de couplage

Elle se fait en deux étapes (Fig.32) : les agents de couplages (carbodiimides) activent d'abord les fonctions COOH des particules magnétiques formant ainsi un ester activé qui va ensuite réagir avec les fonction NH_2 de la protéine.

Le carbodiimide que nous avons utilisé est l'EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide hydrochloride). Il attaque les fonctions carboxyles pour former un ester intermédiaire (O-acylsourée) extrêmement réactif mais de courte durée de vie (hydrolyse rapide en solution aqueuse). Généralement, on fait donc réagir ensuite la s-NHS, qui forme un intermédiaire réactionnel plus stable, permettant ainsi le lavage des billes (pour enlever l'excès de réactifs) avant l'ajout des protéines à greffer.

Cette réaction se fait soit en tampon MES (2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic) ($5.5 < \text{pH} < 6.5$) soit en tampon phosphate ($5.8 < \text{pH} < 8.0$). A pH=6 les amines sont protonées et deviennent donc moins réactives vis-à-vis de l'ester s-NHS. Toutefois, à pH basique la vitesse de l'hydrolyse de l'ester augmente. Il faut donc trouver un compromis.

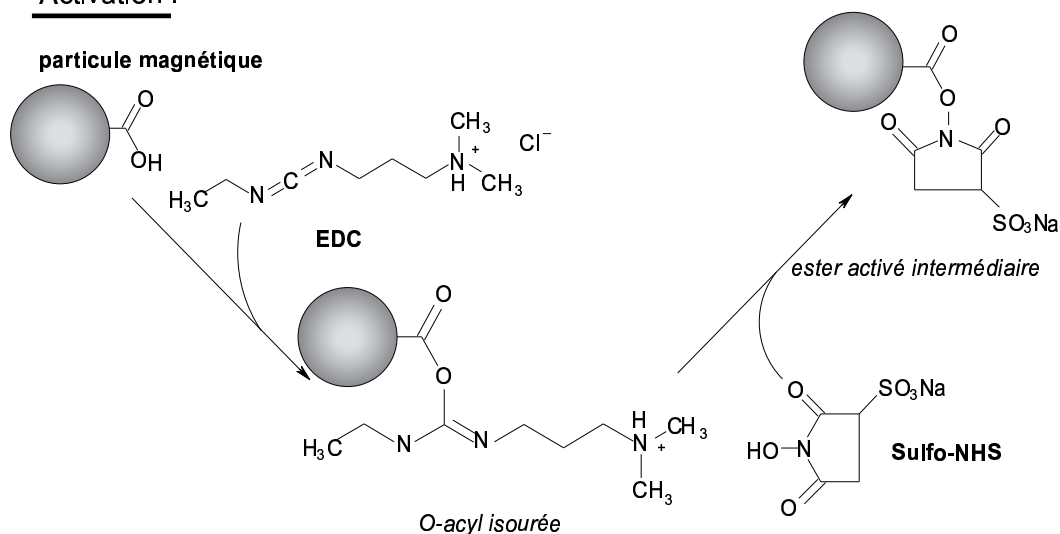
²³On obtient un tampon phosphate 1M pH=7.3 en mélangeant 69 mL de solution de Na_2HPO_4 1M et 31 mL de solution de NaH_2PO_4 1M et en complétant à 1L avec de l'eau milliQ.

Il faut également prendre en compte le pI de la protéine afin de travailler au voisinage de celui-ci, pour faciliter le contact entre les protéines et les surfaces (la charge des premières devenant nulle).

De plus, pour garder les billes stables, la force ionique ne doit pas être trop élevée (stabilisation électrostatique des billes) et un tensioactif non ionique peut être ajouté afin d'améliorer la stabilisation.

La plupart des protocoles développés, dans ce qui suit, se font dans un tampon phosphate 10 mM pH=7.3.

Activation :



Couplage :

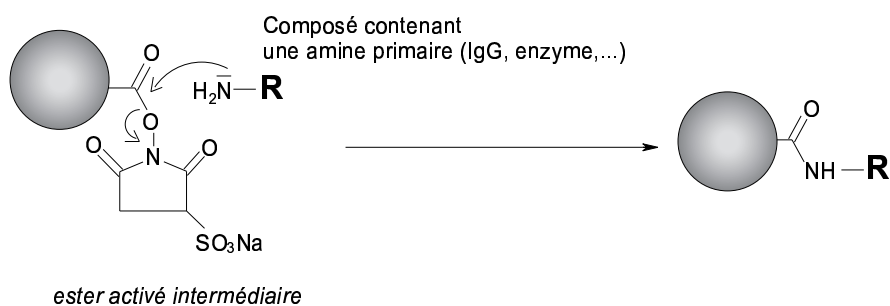


FIG. 32 – Schéma réactionnel du greffage de protéines sur des particules magnétiques fonctionnalisées COOH.

Décoration avec des IgG

Ce travail a été l'objet du stage de 3^{ème} année de l'ESPCI de Florence Thivilliers. L'optimisation du greffage et le dosage des protéines greffées a été effectué par Isabelle Génois (Technicienne, ESPCI).

Protocole de greffage

Notre but est de greffer des IgG sur des chaînes permanentes préalablement organisées dans des microcanaux. La caractérisation du greffage dans les microcanaux est difficile à mettre en oeuvre. On a donc choisi de développer un protocole de greffage dans un tube Eppendorf²⁴. On peut alors étudier l'influence de certains paramètres tels que l'efficacité des agents bloquants, l'influence de la quantité d'anticorps initiale ou des agents de couplage (EDC s-NHS).

On ne se soucie pas de la stabilité des chaînes lors du greffage en tube Eppendorf car dans les microcanaux les chaînes sont fixées et ne risquent pas de se rencontrer. Afin de minimiser le temps de greffage (en vue de transposer le protocole au greffage en microcanaux), le nombre d'étapes est restreint.

Le protocole est détaillé Tab.1.

Protocole La première étape consiste à fabriquer des chaînes permanentes avec du PAA. On greffe ensuite les chaînes avec l'anticorps UCHT1.

Pour ce faire, on mélange directement les anticorps, les réactifs de couplage et les chaînes. On laisse réagir à température ambiante pendant 2 heures. On lave ensuite avec une solution de tween 20 afin d'enlever les anticorps qui sont mal fixés, puis avec un tampon glycine afin de bloquer les groupes COOH encore éventuellement réactifs. On termine par un dernier lavage avec une solution de tween 20.

Révélation Afin de visualiser l'efficacité du greffage, on fait réagir un anticorps secondaire fluorescent (greffé avec de l'Alexa 488) dirigé spécifiquement contre l'anticorps greffé avec les chaînes fonctionnalisées.

On observe l'échantillon en fluorescence avec un microscope inversé (Nikon, Eclipse TE300) équipé d'une lampe au mercure (HBO 100 W) filtrée à $\lambda = 465 - 495$ nm. On observe l'intensité émise à $\lambda = 515 - 555$ nm. L'objectif utilisé est un x100 à immersion à huile avec une ouverture numérique de 1.25 (Nikon). La visualisation se fait grâce à une caméra CCD (COHU) reliée à un ordinateur.

Comme le montre les Fig33 et Fig.34, la surface des chaînes apparaît bien fluorescente : l'anticorps secondaire fluorescent se fixe sur les chaînes ce qui signifie

²⁴On fait l'hypothèse que la réaction de greffage dans les microcanaux est identique à celle en tube Eppendorf.

qu'elles sont fonctionnalisées avec l'anticorps primaire. On vérifie que l'anticorps secondaire ne se fixe pas sur les chaînes non greffées.

Conclusions *On est donc capable de fonctionnaliser des chaînes permanentes obtenues avec du PAA en utilisant les fonctions COOH du PAA.* Il est par contre difficile de garder les chaînes isolées tout au long du greffage. On observe alors des agrégats de chaînes (Fig.33), dus au protocole développé en tube Eppendorf, donc avec des chaînes libres, ce qui est évité en microcanaux avec des chaînes fixées sur la paroi. En manipulant soigneusement, notamment en appliquant un champ magnétique faible pendant une courte durée lors des lavages, on peut limiter l'agrégation des chaînes et obtenir ainsi des chaînes fonctionnalisées isolées (Fig.34).

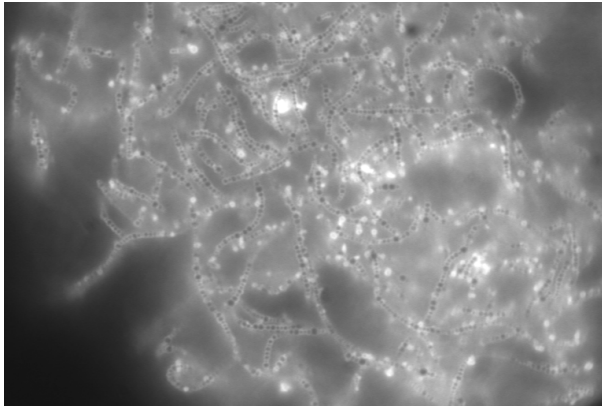
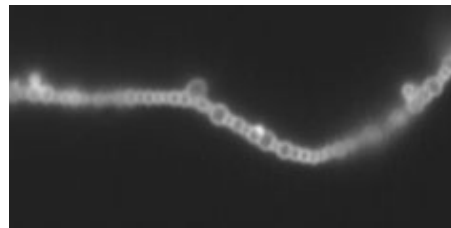


FIG. 33 – Chaînes permanentes PAA greffées avec UCHT1 (Adembeads, diamètre $0.75\mu\text{m}$). Les chaînes sont marquées avec l'IgG anti-souris Alexa 488. Les chaînes se sont emmêlées au cours du greffage.

FIG. 34 – Filament, constitué de particules magnétiques (Adembeads, diamètre $0.75\mu\text{m}$) recouvertes de PAA, greffé avec un IgG de souris anti-CD3. Il est marqué avec de l'anti-souris IgG Alexa 488.



Ces expériences démontrent la faisabilité du greffage sur des chaînes irréversibles obtenues avec du PAA. Dans ce qui suit, nous nous intéressons à la spécificité de l'anticorps secondaire, à l'influence des agents bloquants, ainsi qu'à la stabilité dans le temps du greffage.

Spécificité de l'anticorps secondaire

Ces expériences ont pour but de vérifier que notre méthode de révélation est bien spécifique. Pour cela, on prépare un lot de chaînes PAA greffées avec des IgG de souris et un autre greffé avec des IgG de lapin. En utilisant des anticorps secondaires spécifiques (respectivement IgG anti-souris Alexa 488, IgG anti-lapin Alexa 488), on constate que les IgG ont bien été greffés. On vérifie également que des chaînes greffées avec des IgG de souris que l'on a incubées avec des anti-lapin IgG Alexa 488 ne sont pas fluorescentes (et inversement chaînes greffées avec des lapins IgG ne fluorescent pas en présence d'anti-souris IgG Alexa 488)(Fig.35).

Le mode de *révélation* est donc bien *spécifique*. Le protocole est détaillé Tab.2.

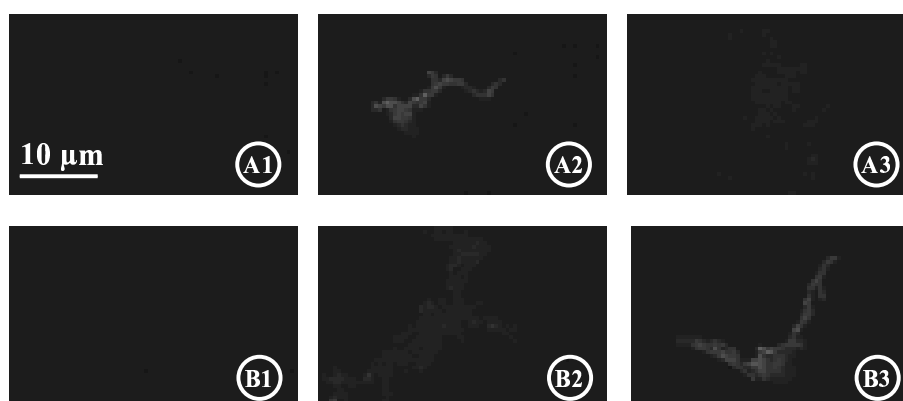


FIG. 35 – Spécificité de l'anticorps secondaire : un lot de chaînes PAA greffées avec des IgG de souris (A) et un autre greffé avec des IgG de lapin (B). Série 1 : ajout d'anticorps fluorescents sur des particules non greffées ; Série 2 : ajout d'anticorps anti-souris marqués avec de l'Alexa 488 ; Série 3 : ajout d'anticorps anti-lapin marqués avec de l'Alexa 488. L'observation est effectuée en épifluorescence sur un microscope Nikon Eclipse TE 300 équipé d'une lampe à mercure pour l'excitation et d'un objectif 100X. La source au mercure est filtrée à $\lambda = 450-490$ nm et l'observation se fait à $\lambda = 510-550$ nm.

Remarque : on a également mis en évidence le fait que les groupes *COOH* restent activés même après plusieurs lavages avec une solution de tween 20 et avec un tampon glycine (Tab.2, témoin b).

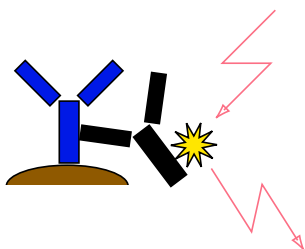


FIG. 36 – Représentation schématique de l'interaction entre un anticorps primaire et un anticorps secondaire fluorescent.

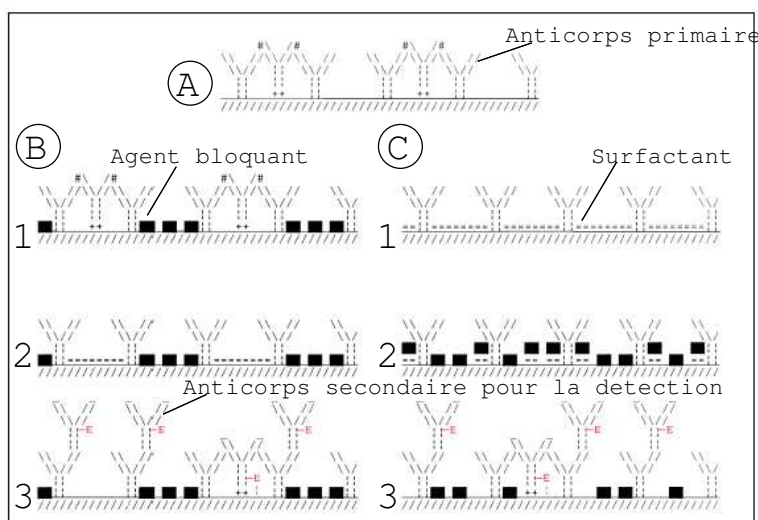


FIG. 37 – Illustration des difficultés de l'utilisation d'agent bloquant (■) et de surfactant (-). A : état de la surface après greffage avant le scénario B ou C. B : 1, on introduit les agents bloquants ; 2, on lave ensuite avec une solution de surfactants. On enlève ainsi les anticorps mal fixés, il apparaît alors des zones "nues" ; 3, on fait réagir l'anticorps secondaire, dont une partie s'adsorbe de façon non spécifique sur les zones "nues". C : 1, on lave avec une solution de surfactants. On enlève ainsi les anticorps mal fixés, les surfactants se déposent sur la surface ; 2, on introduit des agents bloquants. Ils entrent en compétition avec les surfactants pour s'adsorber sur la surface ; 3, on fait réagir l'anticorps secondaire (en l'absence de surfactants). Ils s'adsorbent sur les zones devenues "nues" quand le surfactant est parti. Adapté d'après <http://www.nuncbrand.com/>

Effets des agents bloquants

En fin de greffage, il est nécessaire de protéger les zones non greffées avec des agents dits *bloquants* afin d'éviter toute adsorption non spécifique.

Nous avons étudié à quelle étape il convient d'ajouter l'agent bloquant. La Fig.37 illustre la difficulté du choix de l'ordre d'utilisation de surfactants (qui "nettoient la surface") et d'agents bloquants. Nous avons ainsi étudié l'effet d'une solution de BSA 0.5% en masse, de caséine 0.5% en masse ou de glycine 0.5% en masse ainsi que l'influence du moment où l'on introduit ces agents. Afin de vérifier l'efficacité de l'agent bloquant nous avons incubé les chaînes avec des IgG anti-lapin Alexa 488 et nous avons observé au microscope la fluorescence de l'échantillon. Le protocole est détaillé Tab.3.

Conclusions Pour notre système, une solution de BSA à 0.5% en masse est ce qui convient le mieux. La différence entre les moments où on l'introduit n'est pas flagrante.

Stabilité du greffage

Les IgG greffés ou bien le PAA greffé avec les IgG peuvent se désorber.

Il convient de vérifier que les IgG greffés restent sur les chaînes suffisamment longtemps, à l'échelle de temps d'une expérience (*i.e.* de l'ordre de la semaine).

Protocole On greffe une grande quantité de chaînes irréversibles selon le protocole détaillé Tab.4. On prélève ensuite une partie de l'échantillon que l'on fait réagir avec les anticorps anti-souris Alexa 488. On observe au microscope la fluorescence de l'échantillon. On effectue cette étape de révélation le jour même du greffage, le lendemain et au bout d'une semaine.

Conclusions Dans les trois cas, on observe une forte fluorescence. *Les IgG restent donc bien fixés (au moins une semaine) sur les chaînes irréversibles.*

Dosage plus précis

Nous avons essayé de doser les anticorps greffés de manière indirecte, en faisant réagir des anticorps secondaires fluorescents et en dosant ceux qui n'ont pas réagi.

Deux arguments nous forcent à opérer de la sorte : (i) la présence de billes perturbe le signal (diffusion, adsorption : les particules absorbent dans le bleu/vert Fig.38) donc on ne peut travailler que sur le surnageant, (ii) on ne greffe pas directement les IgG fluorescents car la présence du fluorophore peut perturber le couplage (il y a en moyenne 7 chromophores par IgG (données Molecular Probes)).

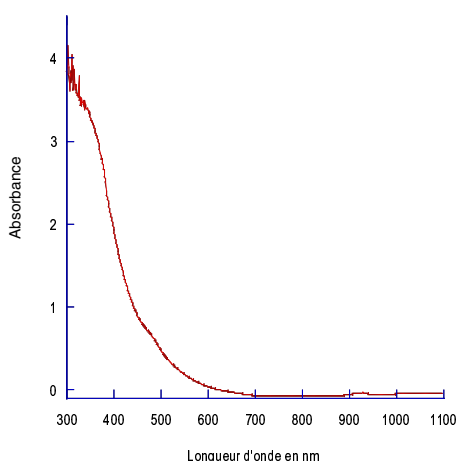


FIG. 38 – Spectre d'adsorption du ferrofluide ADEMTECH (X10FF-500) dilué 40 fois (référence : cuve vide).

Malheureusement, la différence entre la concentration d'anticorps secondaires avant réaction et après réaction n'est pas significative pour permettre une détermination du taux de greffage des particules.

Pour optimiser les conditions de ce test, il faudrait diminuer la quantité d'anticorps secondaires (tout en étant en excès). Mais, le fait de changer la concentration en anticorps secondaires déplace l'équilibre de la réaction anticorps secondaire/anticorps primaire (Fig.47). Il convient donc pour chaque nouvelle concentration d'anticorps secondaires testée de vérifier que l'on est bien à l'équilibre. On pourrait penser laisser incuber un temps infini ($>1h$). Toutefois plus on laisse incuber et plus les interactions non-spécifiques augmentent. Déterminer les conditions expérimentales requiert un grand nombre d'essais facilement réalisable si on opère sur des plaques 96 puits et que l'on possède un fluorimètre qui lit sur ces plaques, ce qui n'est pas notre cas.

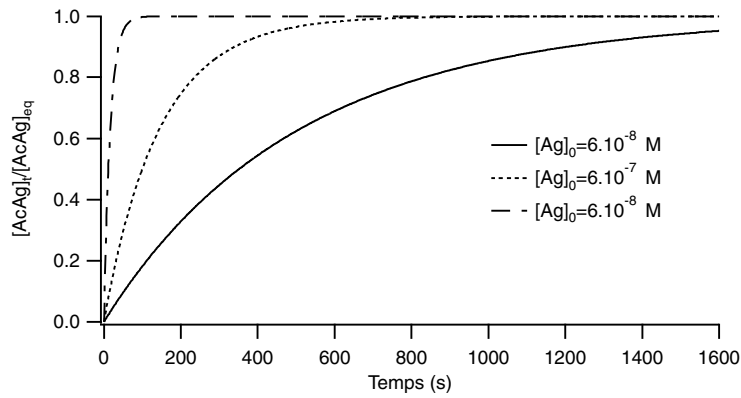


FIG. 39 – Cinétique théorique d'interaction antigène/anticorps. La concentration en anticorps est la même pour les trois courbes : $[Ag]_0 = 6.10^{-8}$ M. $K_A = 10^7$ M $^{-1}$, $k_{on} = 10^4$ M $^{-1}$ s $^{-1}$. Voir l'Annexe 5 pour plus de détails.

Nous avons utilisé le test BCA (détaillé en Annexe 4) qui permet de doser la totalité des protéines greffées sans se soucier de leur nature ni de leur orientation.

Le protocole de greffage est détaillé Tab.5 et celui du dosage par le test BCA est présenté en Annexe 4.3.5.

Résultats Le test BCA montre que 2.6 μ g de protéines ont été greffés par gramme de particules magnétiques, soit environ **63 ng/cm 2** ou encore $2.5 \cdot 10^{11}$ molécules/cm 2 . Un anticorps ($M_W = 150$ kDa) peut être inclus dans un pavé de 15 nm de côté et de 3 nm d'épaisseur. Pour une monocouche dense d'IgG, on obtient une densité de (i) 650ng/cm 2 s'ils sont "debouts", (ii) 130ng/cm 2 s'ils sont "couchés" (iii) 400ng/cm 2 si on prend la moyenne.

On a greffé environ 1/6 ème de monocouche (en moyenne) et ce sans optimisation du protocole²⁵.

²⁵Ce nombre n'est qu'un ordre de grandeur, car au moment du stage de F. Thivilliers toutes les vérifications du test BCA n'avaient pas été effectuées.

Optimisation

A la suite du stage de F. Thivilliers (Elève-ingénieur ESPCI) nous avons utilisé un test (micro BCA) dont le principe est identique au précédent mais qui permet de détecter des quantités plus petites de protéines (Annexe 4.4).

Après nous être assuré que ce test était au point (Annexe 4.4), nous avons fait varier des paramètres essentiels du protocole de greffage comme la quantité d'IgG, la concentration d'EDC, le rapport des concentrations EDC/s-NHS afin de voir leur influence sur l'efficacité du greffage.

Ces expériences ont été effectuées par Isabelle Génois (Technicienne, ESPCI).

Quantité d'IgG Nous avons fait varier la concentration initiale d'IgG. Le protocole est détaillé Tab.6. La quantité greffée sur les particules est déterminée à l'aide d'un test microBCA (voir Annexe 4; Incubation 60 min. à 60 ° C, lecture à 562 nm).

Les résultats sont reportés Fig.40 : plus la concentration d'IgG initiale augmente, plus il y a d'IgG greffés sur les chaînes. La courbe semble saturer vers une valeur qui correspond environ à l'obtention d'une mono-couche d'IgG sur les particules²⁶.

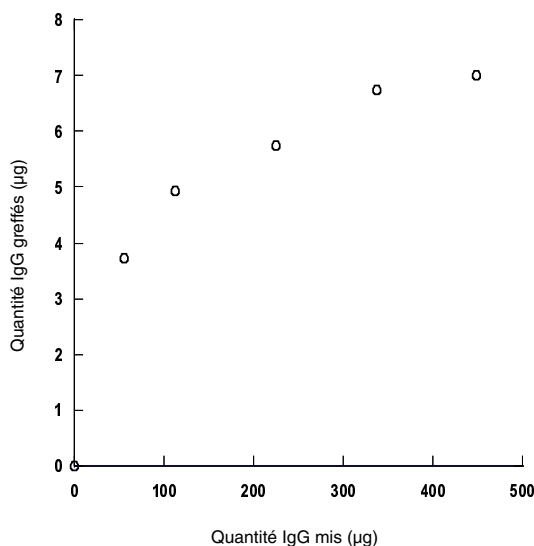


FIG. 40 – Quantité d'IgG greffés en fonction de la quantité d'IgG mis dans la phase continue.

²⁶Ce calcul est purement d'ordre géométrique : on connaît la surface d'une particule ainsi que la densité maximale d'IgG (130ng.cm^{-3} quand ils sont "couchés" ; 650ng.cm^{-3} quand ils sont "debouts"). On en déduit alors que pour $4\mu\text{L}$ de particules V2G, la quantité d'IgG correspond à une mono-couche est comprise entre $2\mu\text{g}$ et $10.5\mu\text{g}$. Le calcul est plus compliqué dans notre cas car les particules sont reliées les unes aux autres et le greffage se fait sur le PAA dont on ne connaît pas la densité de groupes C00H.

Quantité d'EDC Nous regardons l'influence de la quantité d'EDC sur le greffage d'IgG. Nous avons fait varier la quantité d'EDC en gardant constant le rapport EDC/s-NHS (1 mole d'EDC pour une mole de s-NHS). Les conditions expérimentales ainsi que les résultats du dosage des IgG greffées sont détaillées Tab.7.

Quand la quantité d'EDC augmente, la quantité d'IgG augmente. Ceci s'explique par le fait que l'EDC active plus de COOH du PAA. Etant donné que l'on ne connaît pas la concentration en PAA sur les particules, il est difficile d'ajuster la quantité d'EDC en fonction de la quantité de groupes COOH.

Rapport EDC/s-NHS Nous avons fait varier le rapport EDC/s-NHS : (i) 1 mole d'EDC pour 1 mole de s-NHS (ii) 3 moles d'EDC pour 1 mole de s-NHS. Les conditions expérimentales ainsi que les résultats du dosage des IgG greffées sont détaillées Tab.8.

La quantité d'IgG greffés diminue légèrement lorsque le rapport EDC/s-NHS augmente.

Toutes ces observations nous permettent d'obtenir des chaînes irréversibles fonctionnalisées avec la quantité souhaitée d'IgG.

Avec des enzymes

Nous avons greffé une enzyme, la trypsine²⁷, sur les chaînes irréversibles obtenues avec le PAA. Nous avons juste montré la faisabilité de ce greffage et n'avons pas tenté d'améliorer le taux de greffage.

Ce travail a été effectué en collaboration avec Zuzanna Bilkova (Assist. Prof., Department of Biological and Biochemical Sciences Faculty of Chemical Technology, Univerzity of Pardubice) lors de son stage post-doctoral à l'Institut Curie.

Z. Bilkova (*J. Chrom. B*, (770) 177, 2002) a montré que l'immobilisation de trypsines sur des particules magnétiques permet (i) de les retirer du mélange réactionnel, (ii) de les réutiliser (iii) d'améliorer leur stabilité au stockage (fixées, elles ne peuvent plus se digérer entre elles).

Des chaînes magnétiques peuvent être récupérées très rapidement par centrifugation ou par capture magnétique. Insérées dans les canaux d'un laboratoire sur puce, elles peuvent servir de matrice à travers laquelle les protéines sont digérées avant d'être analysées.

Influence de la nature du tensio-actif On a au préalable vérifié l'influence de la nature du tensio-actif sur le greffage de la trypsine. Pour ce faire, on a greffé des particules magnétiques (non agrégées sous forme de chaînes, Adembeads COOH, lot 113e). On a étudié 4 tensio-actifs non ioniques : PE/F127, NP 10,

²⁷<http://www.encyclopedia.com/html/t1/trypsin.asp>

Tween 20 et le Triton X405.

Protocole :

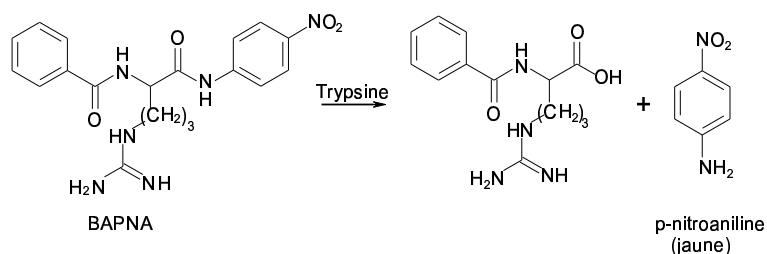
- On lave 5 fois 1mg de billes avec du tampon phosphate 100mM pH=7.3 + (i) PE/F127 0.3% en masse ou (ii) NP 10 0.1% en masse ou (iii) Tween 20 2% en masse ou (iv) Triton X405 0.3% en masse (v) sans tensio-actif.
- On ajoute 3 mg de trypsine, 30 mg EDC, 5 mg s-NHS et on laisse incubé 6 heures à température ambiante.

Greffage des chaînes irréversibles

Protocole :

- on prépare 1mg de chaînes irréversibles avec des particules magnétiques recouvertes de PAA.
- on lave les chaînes avec 200 μ L de tampon phosphate 100 mM, NP 10 0.1% en masse.
- On ajoute 50 μ L de tampon phosphate 100 mM contenant 7.5 mg de trypsine et 5 μ L de benzamidine (à 16 mg.mL⁻¹).
- on ajoute rapidement 500 μ L de tampon phosphate 100 mM contenant 30 mg d'EDC puis 400 μ L de tampon phosphate 100 mM avec 5 mg de s-NHS.
- on laisse incubé 3h à température ambiante.

Révélation On mesure l'activité de l'enzyme greffée en utilisant un substrat synthétique : la BAPNA (N-a-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide).



La trypsine coupe spécifiquement la liaison amide après l'arginine, ce qui conduit à la libération d'un produit de couleur jaune (p-nitroaniline). La concentration de ce composé est mesurée par absorbance à $\lambda=405\text{nm}$ (coefficient d'extinction $\varepsilon= 10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

On effectue une courbe de calibration en faisant réagir des solutions de trypsine de concentration connue avec une concentration fixée de BAPNA ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). On laisse réagir pendant exactement 15 min à température ambiante. On mesure ensuite la densité optique $DO(\lambda= 405\text{nm})$. Pour une concentration en trypsine inférieure à $20\mu\text{g.mL}^{-1}$, la $DO(\lambda= 405\text{nm})$ varie de façon linéaire avec la concentration C de la trypsine ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) : $DO=0.0441 \times C-0.0139$.

En toute rigueur la courbe de calibration doit être faite en même temps que l'expérience car la réaction est très sensible et il est difficile d'avoir une reproductibilité absolue d'un jour à l'autre.

Remarque : on a montré que la présence de Triton X405 dans la phase continue diminuait l'activité de l'enzyme (*Proteolytic microreactors based on magnetic nanoparticles developed for μ chip application*, Z. Bilkova *et al.*, en préparation).

Résultats

Influence de la nature de tensio-actif : les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tensio-actif	PE F127	NP 10	Tween 20	Triton X405	Tampon
C ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de part.)	25	29	27	29	24.8

On greffe sensiblement²⁸ plus d'enzymes (ou du moins elle est plus active) en présence de NP10 ou de Triton. La stabilité des particules est identique dans tous les cas.

Greffage sur les chaînes : le dosage de l'activité de l'enzyme montre que l'on a greffé 2.4 μg d'enzymes actives par mg de particules. Toutefois les chaînes se sont emmêlées lors du greffage et beaucoup ont été perdues lors des étapes de lavages, la valeur donnée n'a donc pas grande signification...

Commentaires Nous avons essayé d'obtenir des chaînes irréversibles à partir de particules préalablement fonctionnalisées avec de la trypsine. Pour ce faire, nous avons lavé les échantillons 3 fois avec une solution de NP10 à 0.1% en masse. On a ensuite placé les billes (i) dans une solution de NP 10 0.1% en masse PAA 0.1% en masse (pH=3.4) ou (ii) dans un tampon 0.5X TBE avec 0.1% en masse de NP 10 et 0.1% en masse de PAA. Dans le premier cas, les particules sont déstabilisées, si on applique un champ magnétique, on n'obtient pas de chaînes. Dans le deuxième cas, les particules sont moins déstabilisées mais on n'obtient pas de chaînes irréversibles.

²⁸Nous n'avons pas estimé l'erreur sur la mesure. Il est donc difficile de discriminer un tensio-actif plutôt qu'un autre. Notons qu'il est quand même préférable d'en mettre.

Date	22/04/2003		
Echantillon	Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5%vol IgG de souris à 10 g/l décongelés à 37°C Agitation des billes V2G		(Faux) Témoin
1- Préparation des chaînes			
Vol. de billes (μl)	4	2	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	tout	tout	
Vol. de Tampon 2	199,8	99,9	
Homogénéisation			
Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5min			
2- Elimination du tampon 2			
Aimant			
Vol. enlevé (μl)	200		
Vol.de Tampon 1 (μl)	150		
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	150		
Vol.de Tampon 1 (μl)	150		
Homogénéisation			
Observation microscopique: on est bien en présence de chaînes			
3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS			
Masse d' EDAC (g) N°lot	0,03		
Masse de s-NHS (g) N°lot	0,005		
Vol. de Tampon 1 (μl)	1000		
4- Activation des COOH			
Vol. d' EDAC+ s-NHS dans billes (μl)	50		
5- Réaction de couplage			
vol d'IgG à 10 g/l (μl) ajouté aux billes	10		
2 heures à Temp. Amb., sous faible agitation, c'est à dire le vortex à sa plus faible vitesse car le volume n'est ici pas suffisant pour utiliser la roue.			
remarque: formation d'agrégats			
6- Arrêt de la réaction			
Aimant			
Vol. enlevé (μl)	tout	100	
Vol.de Tampon 3 (μl)	100	100	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	100		
Vol.de Tampon 4 (μl)	100		
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	100		
Vol.de Tampon 3 (μl)	100		
Observation microscopique: agrégats mais toujours des chaînes			
7- Marquage aux IgG fluo			
IgG fluo anti-mouse 2mg/mL			
vol billes prélevé (μl)	25	50	
vol d'IgG fluo (μl) ajouté aux billes	25	25	
Vol.de Tampon 3 (μl)	50	25	
1 heure à Temp. Amb. sous faible agitation			
6- Arrêt de la réaction			
Aimant			
Vol. enlevé (μl)	tout	tout	
Vol.de Tampon 3 (μl)	100	100	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	100	100	
Vol.de Tampon 3 (μl)	100	100	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (μl)	100	100	
Vol.de Tampon 3 (μl)	100	100	
Observation microscopique: agrégats mais toujours des chaînes			
Solutions Tampon			
	Type de Tampon	Date de fabrication	Manipulateur
1	Phosphate-10mM -pH 7 -	/01/03	CR
2	aqueux-PAA 0,1%wt + NP10 0,1%wt	22/04/2003	FT
3	aqueux-tween 20 0,2%wt	01/04/2003	FT
4	aqueux-glycine 15g/L	01/04/2003	FT
7- Conclusions: les chaînes greffées avec des IgG fluorescent très bien tandis que le (faux) témoin ne fluoresce que par la présence de poussières florescentes emprisonnées dans les agrégats. Il y a donc bien greffage d'IgG primaires sur les chaînes. Le marquage aux fluorophores semble spécifique mais la non spécificité sera testée plus tard.			

TAB. 1 – Protocole de greffage d'IgG (UCHT1) sur des chaînes permanentes obtenues avec des particules recouvertes de PAA.

Date	28/04/2003		28/04/2003	
Echantillon	Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5%vol IgG de souris à 10 g/l décongelés à temp. amb. Agitation des billes V2G	(Faux) Témoin	(Faux) Témoin	

1- Préparation des chaînes

lot1	lot 2				
Vol. de billes (µl)	4	4			
Homogénéisation + Aimant					
Vol. enlevé (µl)	tout	tout			
Vol. de Tampon 2	199,8	199,8			
Homogénéisation					
Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5 min					

2- Elimination du tampon 2

Aimant				
Vol. enlevé (µl)	200		200	
Vol.de Tampon1 (µl)	150		150	
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	150		150	
Vol.de Tampon 1 (µl)	150		150	
Homogénéisation				
Observation microscopique:	on est bien en présence de chaînes	le lot 2 va être utilisé pour faire 3 témoins		

3-Séparation du lot 2 en 3 témoins

Vol. de billes en tp1 (µl)	témoin a	témoin b	témoin c
	50	50	50

3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS

Masse d'EDAC (g) N°lot	0,03
Masse de s-NHS (g) N°lot	0,005
Vol. de Tampon 1 (µl)	1000

4- Activation des COOH

Vol. d'EDAC + s-NHS dans billes (µl)	50	0	16,6	16,6
--------------------------------------	----	---	------	------

5- Réaction de couplage

vol d'IgG souris à 10 g/l (µl) ajouté aux billes	10	3,3	0	0
vol d'IgG lapin à 0,4 g/l (µl)				82,5
2 heures à Temp. Amb., sous faible agitation				
remarque: formation d'agrégats				

6- Arrêt de la réaction

Aimant				
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	tout	tout
Vol.de Tampon 3 (µl)	100	20	20	20
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100	20	20	20
Vol.de Tampon 4 (µl)	100	20	20	20
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100	20	20	20
Vol.de Tampon 3 (µl)	100	20	20	20
Observation microscopique:	agrégats mais toujours des chaînes			

7- Marquage aux IgG fluo anti-mouse

IgG fluo anti-mouse 2mg/mL				
vol billes prélevé (µl)	25	5	5	5
vol d'IgG fluo (µl) ajouté aux billes	15	5	5	5
Vol.de Tampon 3 (µl)	60	23,3	23,3	23,3
1 heure à Temp. Amb. sous faible agitation				

6- Arrêt de la réaction

Aimant				
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	tout	tout
Vol.de Tampon 3 (µl)	100	30	30	30
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100	30	30	30
Vol.de Tampon 3 (µl)	100	30	30	30
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100	30	30	30
Vol.de Tampon 3 (µl)	100	30	30	30
Observation microscopique:	agrégats mais toujours des chaînes			

7- Marquage aux IgG fluo anti-rabbit

IgG fluo anti-rabbit 2mg/mL				
vol billes prélevé (µl)	25			
vol d'IgG fluo (µl) ajouté aux billes	15			
Vol.de Tampon 3 (µl)	50			
1 heure à Temp. Amb. sous faible agitation				

6- Arrêt de la réaction

Aimant				
Vol. enlevé (µl)	tout			
Vol.de Tampon 3 (µl)	100			
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100			
Vol.de Tampon 3 (µl)	100			
Homogénéisation + Aimant				
Vol. enlevé (µl)	100			
Vol.de Tampon 3 (µl)	100			

	Type de Tampon	Date de fabrication	Manipulateur
Solutions Tampon	1	Phosphate-10mM -pH 7 -	01/03
	2	aqueux-PAA 0,1%wt + NP10 0,1%wt	22/04/2003
	3	aqueux-tween 20 0,2%wt	01/04/2003
	4	aqueux-glycine 15g/L	01/04/2003

7- Conclusions: les mesures au fluo n'ont rien donné à cause de problème de sensibilité observations au microscope: -témoin anti-rabbit: pas de fluo donc il y a bien spécificité de couplage IgG primaire/ IgG secondaire.
témoin a: fluorescence donc l'IgG primaire s'est adsorbé à la surface, sans liaison covalente.
témoin b: faible fluorescence donc la surface est restée suffisamment longtemps active pour que des IgG secondaires réagissent avec les COO-
témoin c: pas de fluorescence donc l'IgG secondaire anti-mouse reconnaît spécifiquement son primaire.

TAB. 2 – Protocole permettant de vérifier que le mode de révélation utilisé est bien spécifique

Date 06/05/2003

on veut tester ici l'efficacité des agents bloquants BSA, Glycine et Caséine et l'impact du lavage sur cette efficacité.

Echantillon
Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5%vol
IgG de souris à 10 g/l décongelés à temp. amb.
Agitation des billes V2G

1- Préparation des chaînes
Vol. de billes (µl) 12
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 2 599.4
Homogénéisation
Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5min

2. Elimination du tampon 2
Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 1 (µl) 450
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 450
Vol. de Tampon 1 (µl) 450
Homogénéisation
Observation microscopique: on est bien en présence de chaînes

3. Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS
Masse d'EDAC (g) N°lot 0.015
Masse de s-NHS (g) N°lot 0.0025
Vol. de Tampon 1 (µl) 500

4. Activation des COOH
Vol. d'EDAC + s-NHS dans billes (µl) 150

5. Réaction de couplage
vol d'IgG à 10 g/10 (µl) ajouté aux billes 30
2 heures à Temp. Amb., sous faible agitation
remarque: formation d'agrégats

6-Aliquotage en 6 tubes de 100µl afin de pouvoir tester les 3 agents bloquants et d'effectuer le blocage avant ou après le lavage par le tampon 3.

lot1: BSA-lav lot2: BSA-bloc lot3: casé-lav lot4: casé-bloc lot5: gly-lav

7- Arrêt de la réaction de couplage par lavage pour 3 lots
Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 3 (µl) 100
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 100
Vol. de Tampon 3 (µl) 100
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 100
Vol. de Tampon 3 (µl) 100

8-Blocage
Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 5 (µl) 100
Vol. de Tampon 6 (µl) 100
Vol. de Tampon 7 (µl) 100
Homogénéisation
15min à temp. amb. sous faible agitation

9- Arrêt de la réaction de blocage et lavage pour les lots 2,4 et 6
Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 3 (µl) 100
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 100
Vol. de Tampon 3 (µl) 100
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 100
Vol. de Tampon 3 (µl) 50

tous les échantillons se trouvent maintenant en tampon 3 et vont être marqués aux IgG fluo. anti-mouse et anti-rabbit.
chaque lot est séparé en 2 pour faire un marquage aux anti-M et un marquage aux anti-R.

10- Marquage aux IgG fluo
vol billes prélevé (µl) 12.5
vol d'IgG fluo anti-M (µl) ajouté aux billes 7.5
vol d'IgG fluo anti-R (µl) ajouté aux billes 7.5
Vol. de Tampon 3 (µl) 30
1 heure à Temp. Amb. sous faible agitation

11- Arrêt de la réaction de marquage
Aimant
Vol. enlevé (µl) tout
Vol. de Tampon 3 (µl) 50
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 50
Vol. de Tampon 3 (µl) 50
Homogénéisation + Aimant
Vol. enlevé (µl) 50
Vol. de Tampon 3 (µl) 50
Observations des chaînes au microscope fluo

Solutions Tampon

	Type de Tampon	Date de fabrication	Manipulateur
1	Phosphate-10mM pH 7	01/03	CR
2	aqueux-PAA 0.1%wt + NP10 0.1%wt	22/04/2003	FT
3	aqueux-tween 20 0.2%wt	01/04/2003	FT
4	aqueux-glycine 15g/L	01/04/2003	FT
5	m 1- BSA 0.5%wt	06/04/2003	FT
6	m 1- Caséine 0.5%wt	07/04/2003	FT
7	m 1- Glycine 0.5%wt	08/04/2003	FT

remarque: la caséine se dissout mal, on chauffe un peu l'échantillon au bain marie

observations au microscope fluo

	lavage		blocage	
	anti-M	anti-R	anti-M	anti-R
BSA	+++	++	+++	++
Caséine	+++	++	+++	++
Glycine	+++	++	+++	++

+++": très fluo
++": pas du tout fluo
++": fluo
+": très légère fluo
+": moyennement fluo

7- Conclusions: l'utilisation d'un agent bloquant semble bien réduire l'adsorption non spécifique des anti-R.
la BSA semble être l'agent bloquant le plus efficace.
la différence entre effectuer le lavage avant ou après le blocage n'est pas flagrante.

Remarque: la stabilité de ce greffage en présence d'agents bloquants a été vérifiée à +1 semaine

TAB. 3 – Protocole utilisé pour vérifier l'influence des agents bloquants.

Date**Echantillon**

29/04/2003

J+1

stabilité à 1 jour

05/05/2003

S+1

stabilité à 1 semaine

on étudie la stabilité du greffage des IgG primaires effectué le 28/04/03
on prélève les billes greffées dans le lot 1

7- Marquage aux IgG fluo

IgG fluo anti-mouse 2mg/mL

vol billes prélevé dans lot1 (µl)

vol d'IgG fluo (µl) ajouté aux billes

Vol.de Tampon 3 (µl)

25		20	
15		12	
50		48	

1 heure à Temp. Amb. sous faible agitation

6- Arrêt de la réaction

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol.de Tampon 3 (µl)

tout		tout	
100		80	

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol.de Tampon 3 (µl)

100		80	
100		80	

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol.de Tampon 3 (µl)

100		80	
100		80	

Observation microscopique: pelottes mais toujours des chaînes

Solutions Tampon

	Type de Tampon	Date de fabrication	Manipulateur
1	Phosphate-10mM -pH 7 -	/01/03	CR
2	aqueux-PAA 0,1%wt + NP10 0,1%wt	22/04/2003	FT
3	aqueux-tween 20 0,2%wt	01/04/2003	FT
4	aqueux-glycine 15g/L	01/04/2003	FT

7- Conclusions: les chaînes fluorescent toujours fortement, que ce soit à J+1 ou S+1, donc le greffage a tenu.

TAB. 4 – Vérification de la stabilité du greffage.

Date	02/06/2003		
Echantillon	échantillon		témoin
Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5%vol IgG de lapin à 4 g/l décongelés à 37°C Agitation des billes V2G			
1- Préparation des chaînes			
Vol. de billes (µl)	16	16	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	
Vol. de Tampon 2	799,2	799,2	
Homogénéisation			
Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 4min			
2- Elimination du tampon 2			
Aimant			
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	
Vol.de Tampon1 (µl)	600	600	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (µl)	600	600	
Vol.de Tampon 1 (µl)	600	600	
Homogénéisation			
3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS			
Masse d'EDAC (g) N°lot	0,015		
Masse de s-NHS (g) N°lot	0,0025		
Vol. de Tampon 1 (µl)	500		
4- Activation des COOH			
Vol. d'EDAC+ s-NHS dans billes (µl)	200	200	
5- Réaction de couplage			
vol d'IgG à 4 g/l (µl) ajouté aux billes	50	0	
2 heures à Temp. Amb., sous faible agitation, c'est à dire le vortex à sa plus faible vitesse car le volume n'est ici pas suffisant pour utiliser la roue.			
remarque: formation d'agrégats			
6- Arrêt de la réaction			
Aimant			
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	
Vol.de Tampon 5 (µl)	800	800	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (µl)	800	800	
Vol.de Tampon 5 (µl)	800	800	
Homogénéisation + Aimant			
Vol. enlevé (µl)	800	800	
Vol.de Tampon 5 (µl)	800	800	
Observation microscopique:	pelottes mais toujours des chaînes		
7-préparation pour mesure d'absorbance			
Vol. enlevé (µl)	tout	tout	
Vol.de Tampon 5 (µl)	25	25	
vol de sol. De réactif du kit BCA (µl)	500	500	
Solutions Tampon			
	Type de Tampon	Date de fabrication	Manipulateur
1	Phosphate-10mM -pH 7 -	01/03	CR
2	aqueux-PAA 0,1%wt + NP10 0,1%wt	22/04/2003	FT
5	Phosphate- 10mM- pH 7,35 tween 20 0,2%wt	06/03/2003	GI

Conclusion: à l'aide de la courbe d'étalonnage, on obtient la quantité d'IgG greffés: m=4,1µg; or on a 1,6mg de billes; on a donc greffé 2,6µg/mg de bille.

En sachant que 1mg de billes représente 39,8cm², on en déduit que l'on a greffé environ 63ng/cm².

TAB. 5 – Greffage de chaînes irréversibles en vue de quantifier le nombre de protéines greffées par le test BCA.

Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5% vol
 IgG de souris à 2,808 g/L à 37°C + agitation (aliquots de 40µL)
 Agitation des billes V2G

1- Préparation des billes V2G

Vol. de billes à 5% (µl)

Vol. de Tampon 1 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5 minutes

Témoin 1	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5
4	4	4	4	4	4
196	196	196	196	196	196

2- Elimination du tampon 1

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation

200	200	200	200	200	200
150	150	150	150	150	150
150	150	150	150	150	150
	150	150	150	150	150

3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS

Masse d' EDAC (g) N°lot

Masse de s-NHS (g) N°lot

Vol. de Tampon 2 (µl)

0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
0,034	0,034	0,034	0,034	0,034
1000	1000	1000	1000	1000

3- Activation des COOH

Vol. d' EDAC+ s-NHS dans billes (µl)

20 min. à 44°C

100	100	100	100	100
-----	-----	-----	-----	-----

4- Elimination de l'excès d'EDAC et NHS

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation

tout	tout	tout	tout	tout
2*250	2*250	2*250	2*250	2*250
2*250	2*250	2*250	2*250	2*250
140	120	80	40	0

5- Réaction de couplage

Vol. d'IgG à 2,808g/L ajouté aux billes (µl)

(INVERSE) 30 min à 44°C

20	40	80	120	160
----	----	----	-----	-----

6- Arrêt de la réaction

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation

	tout	tout	tout	tout	tout
	2*250	2*250	2*250	2*250	2*250
	2*250	2*250	2*250	2*250	2*250
300	300	300	300	300	300

Conservation au frigo

Type de Tampon

1 aqueux-PAA à 0,1% wt + NP10 à 0,1%

Solutions Tampon

2 Phosphate 10mM -pH 7,3

Tester IgG seuls : 10 µL mouse IgG + 290 µL Tp phosphate 10mM, pH 7,3

TAB. 6 – Variation de la quantité d'IgG initiale.

Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5% vol
IgG de souris à 0,93 g/L à 37°C + agitation (aliquots de 40µL)
Agitation des billes V2G

		2 fois		2 fois				
		Témoin	Essai 1	Essai 2				
		4	4	4				
		196	196	196				
Homogénéisation + Aimant								
Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5 minutes								
2- Elimination du tampon 1								
Aimant								
Vol. enlevé (µl)		200	200	200				
Vol. de Tampon 2 (µl)		150	150	150				
Homogénéisation + Aimant								
Vol. enlevé (µl)		150	150	150				
Vol. de Tampon 2 (µl)			150	150				
Homogénéisation								
3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS								
Masse d' EDAC (g) N°lot		0,03	0,06					
Masse de s-NHS (g) N°lot		0,034	0,068					
Vol. de Tampon 2 (µl)		1000	100					
4- Activation des COOH								
Vol. d' EDAC+ s-NHS dans billes (µl)		50	50					
5- Réaction de couplage								
Vol. d'IgG à 0,93g/L ajouté aux billes (µl)		40	40					
Agitation 1h à température ambiante								
6- Arrêt de la réaction : prendre son temps entre chaque lavages								
Aimant								
Vol. enlevé (µl)		tout	tout					
Vol. de Tampon 3 (µl)		100 Tp 2	100 Tp 2					
Homogénéisation + Aimant								
Vol. enlevé (µl)		100	100					
Vol. de Tampon 4 (µl)								
Homogénéisation + Aimant								
Vol. enlevé (µl)								
Vol. de Tampon 3 (µl)								
Homogénéisation + Aimant								
Vol. enlevé (µl)								
Vol. de Tampon 2 (µl)		300	300	300				
Homogénéisation								
Conservation au frigo	Type de Tampon		Témoin	Essai 1a	Essai 1b	Essai 2a	Essai 2b	
	1	aqueux-PAA à 0,1%wt + NP10 à 0,1%	V billes V2G à 5% (µL)	4	0	0	0	0
Solutions Tampon	2	Phosphate 10mM -pH 7,3	V billes V2G à 5% greffées avec mouse IgG (µL)	0	4	4	4	4
	3	aqueux-Tween 20 à 0,2%wt	V BP 10mM pH7,3 (µL)	300	300	300	300	300
	4	aqueux-glycine à 1,5g/L	V réactif WR (µL)	300	300	300	300	300
			Incubation 60 minutes à 60°C.					
		Lecture à 562 nm.						
		Absorbance		0,8297	1,5574	2,0418	2,6081	
		Absorbance contre l'air	0,3242	1,154	1,8822	2,3481	2,9705	

TAB. 7 – Variation de la quantité d'EDC (rapport équimolaire d'EDC et de s-NHS).

Utilisation de l'échantillon de billes V2G à 5% vol
IgG de souris à 0,7 g/L à 37°C + agitation (aliquots de 40µL)
Agitation des billes V2G

1- Préparation des billes V2G

Vol. de billes à 5% (µl)

Vol. de Tampon 1 (µl)

Homogénéisation + Aimant

	1 fois	2 fois
Témoin	Essai 1	Essai 2
4	4	4
196	196	196

Echantillon placé dans une bobine sous 15mT pendant 5 minutes

2- Elimination du tampon 1

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation

200	200	200
150	150	150
150	150	150
	150	150

3- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS

Masse d'EDAC (g) N°lot

Masse de s-NHS (g) N°lot

Vol. de Tampon 2 (µl)

0,03	0,03
0,034	0,01
1000	1000

4- Activation des COOH

Vol. d'EDAC+ s-NHS dans billes (µl)

50	50
----	----

5- Réaction de couplage

Vol. d'IgG à 0,7g/L ajouté aux billes (µl)

Agitation 1h à température ambiante

40	40
----	----

6- Arrêt de la réaction : prendre son temps entre chaque lavages

Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 3 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 4 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 3 (µl)

Homogénéisation + Aimant

Vol. enlevé (µl)

Vol. de Tampon 2 (µl)

Homogénéisation

300	300	300
-----	-----	-----

Conservation au frigo

Solutions Tampon

Type de Tampon	
1	aqueux-PAA à 0,1%wt + NP10 à 0,1%
2	Phosphate 10mM -pH 7,3
3	aqueux-Tween 20 à 0,2%wt
4	aqueux-glycine à 1,5g/L

	Témoin	Essai 1	Essai 2a	Essai 2b
V billes V2G à 5% (µL)	2+2	0	0	0
V billes V2G à 5% greffées avec mouse IgG (µL)	0	2+2	4	4
V BP 10mM pH7,3 (µL)	300	300	300	300
V réactif WR (µL)	300	300	300	300
Incubation 60 minutes à 60°C. Lecture à 562 nm.				
Absorbance		0,7357	0,5171	0,5292
Absorbance contre l'air	0,3245	1,0602	0,8411	0,8533

TAB. 8 – Variation du rapport molaire EDC/s-NHS.

Annexe 3 : Filaments formés de liens spécifiques biologiques

Produits

- **Plasma** contenant le Facteur de von Willebrand (DIAGNOSTICA STAGO) sous forme de poudre. Il est stocké au réfrigérateur. Pour le reconstituer on ajoute 1 mL d'eau milliQ, on obtient alors une solution (dite à 200%) qui contient $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vWF. On dilue le plasma avec l'Owren's buffer (Sigma O 1002 sodium barbital 28nmol/L Sodium Chloride 125 nmole/L pH 7,35 ; p739). Le plasma est stocké dilué une semaine maximum à 12°C (dans une étuve).
- **Milieu réactionnel** : utilisé par la société DIAGNOSTICA STAGO dans leurs tests d'agglutination. Il contient entre autre de la glycine (7.5 g.L^{-1}), de l'EDTA (11.2 g.L^{-1}), NaCl (23.4 g.L^{-1}), du PEG 35 000 (3 g.L^{-1}), du tween 20 (3 g.L^{-1}), de la soude (8.3 g.L^{-1}). A stocker à 4°C .
- **Anticorps** : IgG polyclonal de lapin anti-Facteur de von Willebrand humain (DIAGNOSTICA STAGO) noté *anti-vWF IgG*. Il est stocké au congélateur (-20°C) par aliquot de $50 \mu\text{L}$ à 0.4 g.L^{-1} dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7.3.
- **Particules magnétiques Lot EPN** : ces particules nous sont fournies par la société ADEMTECH. Ce sont des particules COOH, de diamètre 207 nm, de concentration $\phi = 3,2\%$ en masse. La phase continue est : Triton X405 $2,1 \text{ g.L}^{-1}$, NaN_3 0,09% en masse.
- **Tensio-actif** : le Tween 20 ou Polyoxyethylene sorbitan monolaurate. $\text{CMC} = 8.10^{-5} \text{ M}$, $M_W = 1228 \text{ g.mol}^{-1}$, HLB : 16.7 (Aldrich [27,434-8]).
- **Réactifs de greffage** : réactifs utilisés pour coupler des molécules (l'une portant une fonction COOH, l'autre NH_2), via une liaison peptidique.
 - N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride ou EDC, $M_W = 191.7 \text{ g.mol}^{-1}$, (Aldrich,[16,146-2])

- N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt ou s-NHS, $M_W = 217.1 \text{ g.mol}^{-1}$, (Fluka,[56485]).
- **Agent bloquant** : Glycine (Sigma, [G 8898]), $C_2H_5NO_2$, $M_W = 75.07 \text{ g.mol}^{-1}$.
- **Tampons** :
 - Tampon phosphate 10 mM, pH=7.3²⁹ Tween 20 0.2% en masse;
 - Tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, Tween 20 0.2% en masse, Glycine 15 g.L⁻¹;
 - Tampon MES 20 mM pH=5.5, Tween 20 0.2% en masse.

Obtention de filaments magnétiques

Nous avons utilisé le protocole (Fig.42) développé par C. Rouzeau et A. Koenig (ESPCI, Paris) pour greffer des IgG de lapin anti-vWF humain sur des particules de diamètre 207 nm.

On s'assure que les particules répondent bien aux critères requis : elles sont bien stabilisées en fin de greffage de même qu'après ajout de plasma (Fig.41 A. et B.). Lorsque l'on applique un champ magnétique en présence de plasma, des chaînes irréversibles se forment (Fig.41 C.).

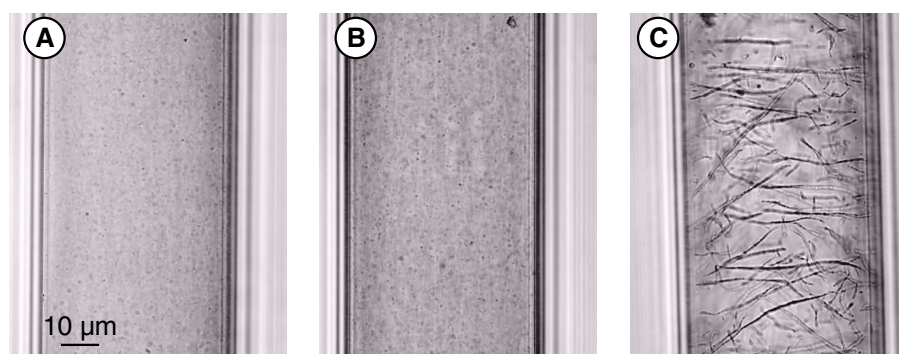


FIG. 41 – A : particules EPN greffées avec des IgG anti-vWF , B : après application d'un champ magnétique (70 mT) pendant 5 min en absence de plasma; C : après application d'un champ magnétique (70 mT) pendant 5 min en présence de plasma. Clichés Catherine Rouzeau (LCMD,ESPCI, Paris).

Le protocole utilisé pour fabriquer les chaînes décrites dans le Chapitre 3 est inspiré de celui utilisé pour des tests d'agglutination :

- Chauffer une lame de verre à 37°C;

²⁹On obtient un tampon phosphate 1M pH=7.3 en mélangeant 69 mL de solution de Na_2HPO_4 1M et 31 mL de solution de NaH_2PO_4 1M et en complétant à 1L avec de l'eau milliQ.

- Mélanger le plasma ($3\ \mu\text{L}$ à $4\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vWF) et le milieu réactionnel ($6\ \mu\text{L}$) sur la lame de verre. Laisser 4 min à 37°C ;
- Ajouter les billes ($9\ \mu\text{L}$ à 0,4% en masse). Mélanger et incubé 4 min à 37°C ;
- Remplir un capillaire ($200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$) avec ce mélange. Le fixer sur une lame avec du ruban adhésif;
- Mettre au coeur d'une bobine à 7,5 A (70 mT) pendant 5 minutes.

Date		
Echantillon		Témoïn
Bain thermostaté à 37°C IgG à 0,4 g/l à 37°C + agitation Agitation des billes EPN		
1- Préparation des billes EPN		
Vol. de billes (µl)	32	32
Vol. de Tampon 1 (µl)	18	18
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	50	50
Vol. de Tampon 1	50	50
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	50	50
Vol. de Tampon 1	50	50
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	50	50
Vol. de Tampon 1	50	50
Homogénéisation		
Observation microscopique		
2- Préparation de la solution d'EDAC + s-NHS		
Masse d' EDAC (g) N°lot	0,06	
Masse de s-NHS (g) N°lot	0,01	
Vol. de Tampon 1 (µl)	100	
3- Activation des COOH		
Vol. d' EDAC+ s-NHS dans billes (µl)	50	Tampon 1 50
20 min. à 44°C		
4- Elimination de l'excès d'EDAC et NHS		
Aimant		
Vol. enlevé (µl)	100	100
Vol. de Tampon 2 (µl)	100	100
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	100	100
Vol. de Tampon 2 (µl)	50	50
Homogénéisation		
Observation microscopique		
5- Réaction de couplage		
Vol. Billes dans IgG à 0,4 g/l (µl)	50	50
30 min à 44°C		
6- Arrêt de la réaction		
Aimant		
Vol. enlevé (µl)	100	100
Vol. de Tampon 3 (µl)	100	100
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	100	100
Vol. de Tampon 3 (µl)	100	100
Homogénéisation + Aimant		
Vol. enlevé (µl)	100	100
Vol. de Tampon 3 (µl)	100	100
Homogénéisation		
Observation microscopique		
Conservation au frigo		
	Type de Tampon	Date de fabrication
Solutions Tampon	1	MES-20mM -pH 5,5 -0,2% Tw20 -0,02% NaN3
	2	Phosphate 10mM -pH 7 -0,2% Tw20 -0,02% NaN3
	3	Phosphate 10mM -pH 7-0,2% Tw20 -0,02% NaN3 -15g/l Glycine

FIG. 42 – Protocole de greffage d'IgG (anti-vWF humain) sur des particules magnétiques de 207 nm de diamètre (lot FPN, Ademtech).

Annexe 4 : Dosage des protéines greffées sur les particules magnétiques

Introduction sur les IgG

Les protéines que nous greffons sur les particules magnétiques sont des anticorps. Leurs dosages font intervenir les réactions antigène/anticorps et demandent la connaissance de la structure de l'anticorps. Nous allons donc brièvement rappeler quelques données sur les anticorps (ou immunoglobuline).

Une immunoglobuline est une protéine fabriquée par des cellules chargées des réactions immunitaires et dirigée de façon spécifique contre un antigène. L'antigène peut venir du milieu extérieur ou de l'organisme. Il y a plus de dix millions d'anticorps différents dans un organisme, ce qui souligne leur spécificité. On distingue les immunoglobulines (Ig) de classe G (IgG), A (IgA), M (IgM), D (IgD) et E (IgE). Selon la classe à laquelle elles appartiennent, elles sont présentes à la surface des cellules ou sécrétées dans les liquides biologiques. Nous nous intéresserons uniquement aux IgG.

Structure

Une IgG est schématisée Fig.43, elle peut être assimilée à un "Y" dont seules les deux extrémités peuvent se lier à l'antigène. Elle présente schématiquement deux structures fonctionnelles, l'une pour la fixation de l'antigène ou Fab (fragment antigen binding), l'autre Fc ou fragment cristallisable qui interagit, soit avec des récepteurs appelés FcR situés à la surface de certaines cellules, soit avec le complément qui désigne une cascade de protéines présentes dans le plasma. La détermination complète de cette structure valut à Porter et Edelman de partager le Prix Nobel de médecine en 1972.

L'hydrolyse d'une molécule d'anticorps par la papaïne conduit à la formation de deux fragments Fab et d'un fragment Fc alors que l'hydrolyse par la pepsine conduit à la formation d'un seul fragment $F(ab')_2$ où les deux fragments Fab restent liés par deux ponts disulfures et le fragment Fc est scindé en plusieurs

peptides. Les fragments Fab et F(ab')₂ ont la capacité de se lier aux antigènes mais le fragment F(ab')₂ le fait avec une plus grande affinité.

Les IgG sont constituées de 4 chaînes identiques 2 à 2 : les *chaînes lourdes* ou *heavy* (H) formées de 446 acides aminés (environ) et les *chaînes légères* ou *light* (L) formées de 214 acides aminés (environ). La chaîne lourde est constituée de 4 domaines tandis que la chaîne légère n'en possède que 2. Certains de ces domaines sont dits constants (CH ou CL) de part la faible variation de séquence dont ils sont l'objet ; a contrario, d'autres en N_{terminal} des F_{ab} sont dits variables (VH ou VL) de part l'éminente variabilité que l'on retrouve dans la séquence.

Si l'on souhaite que l'anticorps soit fonctionnel, il faut le greffer par sa partie Fc afin que les extrémités soient tournées vers l'extérieur.

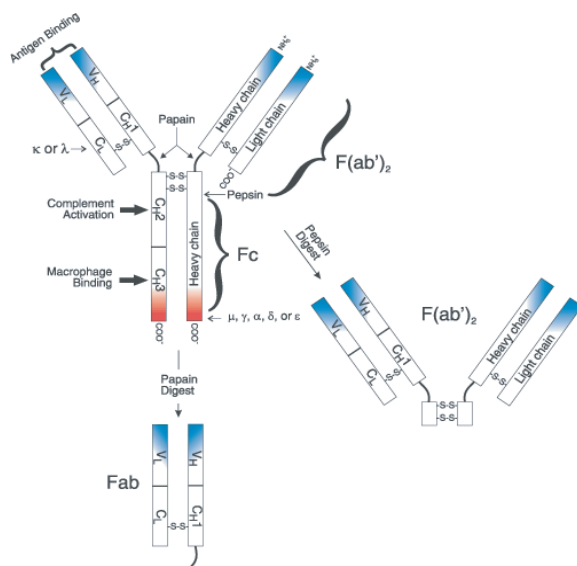


FIG. 43 – Structure d'une immunoglobuline G. Extrait de <http://www.probes.com/handbook/boxes/0439.html>

Anticorps secondaires

L'anticorps d'intérêt est dit *anticorps primaire*. Un anticorps qui réagit avec un anticorps primaire est appelé *anticorps secondaire*.

Prenons l'exemple de la production d'anticorps de souris dirigés contre des anticorps de lapin (Fig.44). De tels anticorps sont appelés souris anti-lapin IgG. Pour ce faire, on introduit des IgG de lapin dans la souris. Le corps de la souris déclenche alors une réponse immunitaire et produit des anticorps dirigés contre ce corps étranger que sont les anticorps de lapin. Il suffit ensuite de récupérer les anticorps et de les purifier par chromatographie d'affinité. Si l'on veut que l'anticorps produit réagisse sur une partie spécifique de l'anticorps de lapin, par exemple la partie Fab, il ne faut introduire que cette partie dans la souris. Ceci explique le coût élevé de ces anticorps, encore plus s'ils sont conjugués à une molécule (radioactive, fluorescente). Certains anticorps sont purifiés à l'extrême

afin de minimiser les réactions croisées ie par exemple, que l'anticorps de souris anti-lapin réagisse avec un IgG humain.

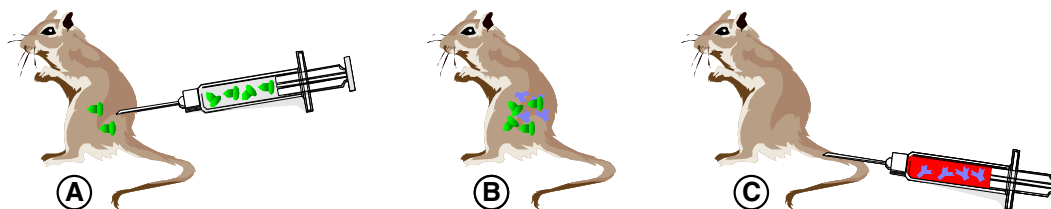


FIG. 44 – Production d'anticorps. Exemple des souris anti-lapin IgG. A : des anticorps de lapin (en vert) sont injectés à la souris, B : réponse immunitaire, production d'anticorps (en bleu), C : récupération des anticorps qui seront ensuite purifiés par chromatographie.

Anticorps monoclonaux–Anticorps polyclonaux

Un antisérum contre un antigène donné contient une population d'anticorps qui reconnaissent des régions diverses de l'antigène avec des affinités différentes. On parle alors de sérum polyclonal et d'*anticorps polyclonaux*.

Les *anticorps monoclonaux* sont eux représentés par une population homogène et monospécifique. Ils sont obtenus in vitro par la technique des hybridomes³⁰.

Réaction antigène/anticorps

Le vocabulaire et les éléments fondamentaux de la réaction antigène-anticorps sont rassemblés sur la Fig.45. Les anticorps sont généralement divalents (deux paratopes). L'antigène schématisé sur la Fig.45 comporte plusieurs épitopes différents (multivalence), permettant sa reconnaissance par des anticorps de spécificité différente.

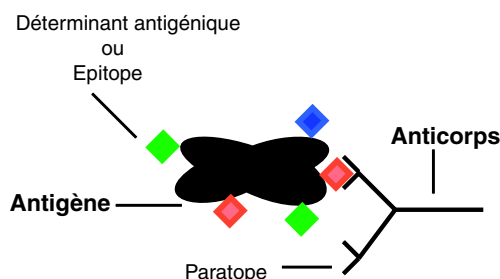
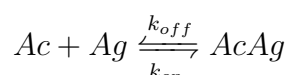


FIG. 45 – Vocabulaire de la réaction antigène/anticorps.

³⁰Cellules "immortalisées". Pour de plus amples informations se reporter à <http://membres.lycos.fr/alexandrevallet/avallet03/defenses/Page1.html>.

La plupart des travaux de modélisation de la réaction antigène-anticorps utilisent à l'origine un modèle de base de cette réaction, conçu à partir d'hypothèses chimiques simples : - la cinétique de cette réaction est réversible, et de premier ordre vis-à-vis de chacun des réactifs, - l'antigène est monovalent vis-à-vis de chaque anticorps spécifique. Il n'existe pas d'effets coopératifs entre les différentes réactions possibles, chaque réaction site-à-site étant indépendante.

La réaction de cinétique entre un site antigénique et un site anticorps, tous deux en solution, peut ainsi s'écrire :



avec : Ac : paratope libre ; Ag : épitope libre ; $AcAg$: complexe antigèneanticorps ; k_{on} : constante de vitesse d'association ; k_{off} : constante de vitesse de dissociation. Ce qui donne la variation de la concentration en complexe par unité de temps :

$$v = \frac{d[AcAg]}{dt} = k_{on}[Ac][Ag] - k_{off}[AcAg] \quad (1)$$

avec entre crochets, les concentrations, fonctions du temps t . Par définition, lorsque l'équilibre est atteint la concentration en complexe $AcAg$ ne varie plus. Dans ce cas, la vitesse v est nulle ce qui implique que

$$[AcAg] = \frac{k_{on}}{k_{off}}[Ac][Ag] \quad (2)$$

Le rapport $\frac{k_{on}}{k_{off}}$ caractérise l'état d'équilibre et est appelé *constante d'affinité* du couple, notée K_A . La *constante de dissociation*, K_D , est définie comme l'inverse de K_A . Les ordres de grandeurs et les unités des différentes constantes sont reportées ci-dessous :

Constante	Unité	Ordres de grandeur
k_{on}	$M^{-1}s^{-1}$	10^4-10^6
k_{off}	s^{-1}	$10^{-4}-10^{-2}$
K_A	M^{-1}	10^6-10^9
K_D	M	$10^{-9}-10^{-6}$

Les paramètres qui nous intéressent sont la quantité de complexe formé à l'équilibre et le temps pour lequel l'équilibre est atteint. Ces paramètres doivent être exprimés en fonction des quantités initiales mises en présence, seules quantités connues.

Quantité de complexe formé à l'équilibre en fonctions des quantités initiales mises en présence

Il faut pour cela appliquer la conservation des espèces :

$$[Ac] = [Ac]_0 - [AcAg]_{equi} \quad (3)$$

et

$$[Ag] = [Ag]_0 - [AcAg]_{equi} \quad (4)$$

$[X]_0$ et $[X]_{equi}$ représentent respectivement la concentration initiale et celle à l'équilibre de l'espèce X. Des équations 2, 3 et 4 ont déduit :

$$[AcAg]_{equi}^2 - [AcAg]_{equi} \left(\frac{1}{K_A} + [Ac]_0 + [Ag]_0 \right) + [Ac]_0[Ag]_0 = 0 \quad (5)$$

La solution de cette équation du second degré est :

$$[AcAg]_{equi} = \frac{1}{2} \left[\frac{1}{K_A} + [Ac]_0 + [Ag]_0 \pm \sqrt{\left(\frac{1}{K_A} + [Ac]_0 + [Ag]_0 \right)^2 - 4[Ac]_0[Ag]_0} \right] \quad (6)$$

La chimie du problème permet d'éliminer une des solutions mathématiques car si $[Ac]_0$ et $[Ag]_0$ sont nulles alors $[AcAg]_{equi}$ doit être nulle. La solution finale est donc :

$$[AcAg]_{equi} = \frac{1}{2} \left[\frac{1}{K_A} + [Ac]_0 + [Ag]_0 - \sqrt{\left(\frac{1}{K_A} + [Ac]_0 + [Ag]_0 \right)^2 - 4[Ac]_0[Ag]_0} \right] \quad (7)$$

Cinétique d'interaction antigène anticorps

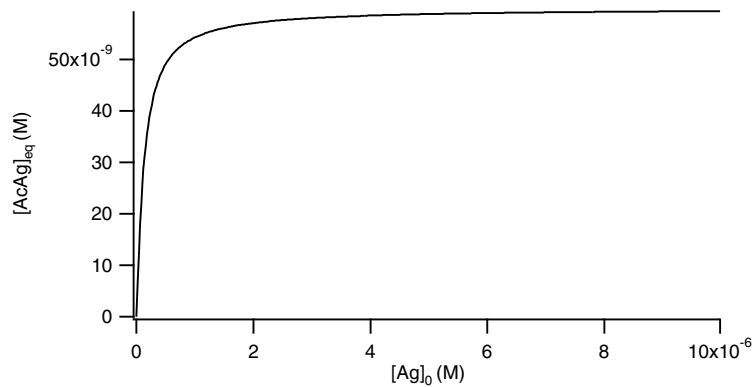


FIG. 46 – Evolution de la quantité de complexe $AcAg$ à l'équilibre en fonction de la quantité initiale en antigène Ag . $K_A = 10^7 \text{ M}^{-1}$; $[Ac]_0 = 6.10^{-8} \text{ M}$.

Nous ne donnerons ici que le résultat³¹.

$$[AcAg](t) = [Ac]_0[Ag]_0 \frac{1 - \exp\left(k_{on} \left(\frac{[Ac]_0[Ag]_0}{[AcAg]_{equi}} - [AcAg]_{equi}\right) t\right)}{[AcAg]_{equi} - \frac{[Ac]_0[Ag]_0}{[AcAg]_{equi}} \exp\left(k_{on} \left(\frac{[Ac]_0[Ag]_0}{[AcAg]_{equi}} - [AcAg]_{equi}\right) t\right)} \quad (8)$$

$[AcAg]_{equi}$ est déterminé par l'Eq.7.

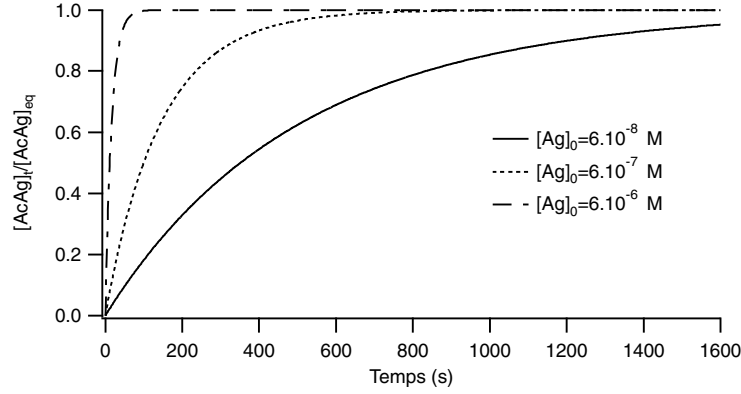
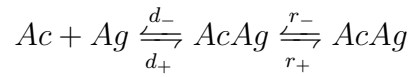


FIG. 47 – Cinétique théorique d'interaction antigène/anticorps. La concentration en anticorps est la même pour les trois courbes : $[Ac]_0 = 6.10^{-8}$ M. $K_A = 10^7$ M⁻¹, $k_{on} = 10^4$ M⁻¹s⁻¹.

Application au cas de molécules multivalentes en phase semi-solide

Ce modèle suppose des réactifs monovalents. Il peut être appliqué pour le cas d'un anticorps possédant deux sites d'interaction, tel qu'une IgG. Il faut alors prendre le double de la concentration en anticorps.

Ce modèle suppose également que les espèces sont "libres" en solution. Si une des espèces est attachée, dans notre cas l'anticorps, elle n'est plus uniformément répartie dans le volume du réacteur. La réaction doit être scindée en deux étapes : (i) la diffusion des antigènes jusqu'au volume contenant les anticorps (ii) la formation du complexe antigène/anticorps :



La constante K_A s'écrit alors $K_A = \frac{d_+ r_+}{d_- r_-}$.

On peut utiliser les équations du modèle en utilisant cette valeur de K_A et en considérant une concentration en anticorps effective. De Lisis *et al.*³² soulignent

³¹Pour de plus amples détails, le lecteur pourra se reporter à la thèse de doctorat de l'université de Paris 7 de Caroline Bressac (1999).

³²De Lisis et al., PNAS, 78(9) : 5569, 1981.

que si la concentration en anticorps greffés est élevée, la probabilité pour un antigène de ré-interagir, une fois libéré d'un premier complexe, est telle qu'en pratique il y a un effet de rétention des antigènes par les anticorps.

Présentation des méthodes de dosage des protéines

On peut diviser les méthodes de dosage de protéines en deux parties : (i) les directes et (ii) les indirectes.

Les *méthodes directes* mesurent directement la concentration en protéines sans passer par un produit intermédiaire. La valeur mesurée correspond à la quantité totale de protéines présentes sans se soucier de leur nature ni de leur état (ie si elle sont fonctionnelles ou non).

Les *méthodes indirectes* consistent à faire réagir un composé spécifique de la protéine à doser puis de détecter ce composé. La valeur mesurée correspond alors au nombre de protéines fonctionnelles. Ce nombre doit donc être inférieur ou égal à celui déterminé avec les méthodes directes.

Le fait que les protéines soient attachées sur des particules complique le dosage. En effet, la présence des particules ou de composés servant à la stabilisation de ces particules peut perturber les dosages.

Nous présentons ci-après les différentes méthodes, utilisées en général pour doser des protéines, en regardant si elles sont applicables ou non au dosage de protéines greffées sur des particules. Les protéines que nous greffons sont des IgG. L'information qui nous intéresse est le nombre d'IgG fonctionnels. Nous verrons qu'elle est difficile à obtenir et qu'il nous faudra parfois nous contenter du nombre total d'IgG.

Méthodes classiques de dosage direct

La méthode la plus précise est l'A.A.A. (*Amino Acid Analysis*). Elle consiste en une hydrolyse acide des protéines suivie d'un dosage des acides aminés par chromatographie échangeuse d'ions, couplée à une détection colorimétrique à deux longueurs d'onde (570 nm et 440 nm) après réaction avec la ninhydrine. Nous ne pouvons employer cette méthode car (i) nous ne possédons pas l'appareillage nécessaire (ii) il faut "décrocher" les protéines des particules ce qui peut être une source d'erreurs : il faut s'assurer que toutes les protéines sont bien décrochées et ont été récupérées.

Plusieurs méthodes plus simples peuvent néanmoins être employées pour quantifier des protéines en solution³³, mais elles sont sensibles à la composition en acides aminés : on ne peut donc remonter à une concentration *absolue* en protéines.

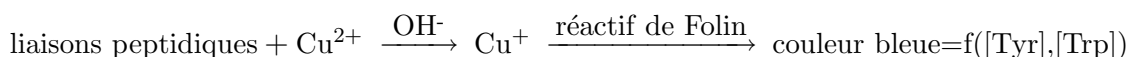
³³M. Fountoulakis *et al.*, J. of Biochemical and Biophysical Methods, **24**, 265-274, 1992.

Absorption UV : avec un spectrophotomètre, on mesure l'absorbance entre 250 et 300 nm et on en déduit la concentration grâce à la loi de Beer-Lambert. L'absorption dépend du nombre de tyrosines (Tyr, $\varepsilon=1280 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) et de tryptophanes (Trp, $\varepsilon=5690 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) donc varie fortement d'une protéine à l'autre.

Remarque : on peut également utiliser les UV lointains car les liaisons peptidiques absorbent fortement entre 190 et 240 nm (on mesure généralement à 205 nm car l'oxygène ainsi que nombre de solvants absorbent à 190 nm).

Dans notre cas, avec les particules, cette méthode est difficile à mettre en œuvre : il faut effectuer un dosage du surnageant car elles absorbent et diffusent la lumière. On doit donc doser ce qui n'a pas réagi. Il faut alors travailler dans des conditions de concentrations telles que la différence entre ce qui a été mis et ce qui a réagi soit suffisamment importante pour être détectée. De plus, suivant le protocole de greffage utilisé (en une ou plusieurs étapes), la présence de certains réactifs de couplage comme l'EDC (N'-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide hydrochloride) peuvent perturber la mesure car ils absorbent à 280 nm.

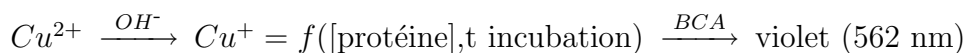
Méthode de Lowry : cette méthode est basée sur la réaction de Biuret



Cette technique permet de mesurer des concentrations comprises entre 0,01 et 1 mg/L. Cette méthode est contraignante dans le choix des tampons et ne peut pas être utilisée en présence de tensio-actifs.

Méthode de Bradford : cette méthode est simple et très utilisée en laboratoire car plus rapide, plus sensible et moins affectée par la présence de produits couramment présents dans des échantillons biologiques que la méthode de Lowry. Un colorant, le bleu de Coomassie G250, se lie à la protéine (de préférence avec arginine et lysine) : il suffit ensuite de lire l'absorbance à 590 nm. Cette méthode est affectée par la présence de tensio-actifs comme par exemple le Tween. Ce colorant, comme c'est le cas pour la plupart des colorants ou marqueurs fluorescents, risque de s'adsorber voire de pénétrer à l'intérieur des particules si celles-ci sont poreuses.

Bicinchoninic Acid Assay ou BCA : cette technique ressemble à la méthode de Lowry et a la même sensibilité mais elle présente l'avantage d'être en une étape car le BCA est stable en milieu alcalin (ce qui n'est pas le cas du réactif de Folin). La réaction est également moins sensible à la présence de certains produits comme les détergents et les agents dénaturants, comme par exemple l'urée. En milieu alcalin, la protéine réduit Cu^{2+} en Cu^+ . Ce dernier est alors détecté par formation d'un complexe violet avec le BCA.



Ce test semble le plus adapté pour notre étude étant donné qu'il n'est pas sensible à la présence de tensio-actifs (contrairement à la méthode de Lowry et celle de Bradford) et qu'il n'utilise pas de colorant (contrairement à la méthode de Bradford) qui risque de pénétrer à l'intérieur des particules. Toutefois, si l'oxyde de fer (Fe_2O_3) contenu dans les particules est mal encapsulé, il pourrait interférer avec le test *i.e.* en oxydant Cu^+ en Cu^{2+} . Dans ce cas la méthode de Bradford devra être envisagée.

Il faut noter qu'un dosage direct dose TOUTES les protéines présentes sur les particules c'est-à-dire aussi bien les IgG que la BSA qui est mise pour améliorer la stabilité des particules et diminuer l'adsorption non-spécifique de protéines. Nous choisissons donc de ne pas utiliser de BSA (ou équivalent) lors du greffage, quitte à travailler avec des particules moins stables.

Dosages indirects

Principe des dosages

Afin de quantifier l'activité des IgG (primaires) greffés sur les particules, la méthode idéale est de faire réagir l'antigène spécifique de l'IgG qui sera ensuite détecté via un IgG dit secondaire (Fig.48.A.). L'IgG secondaire pourra être marqué par un élément radioactif, par un fluorophore ou une enzyme³⁴. Il est souvent difficile voire impossible de se procurer l'antigène spécifique de l'IgG concerné, ce qui restreint l'utilisation de cette méthode.

En l'absence d'antigène spécifique, on ne peut utiliser qu'un anticorps secondaire. Les méthodes de détection de ce dernier sont les mêmes que décrites précédemment. Il faut alors trouver un anticorps secondaire qui va se fixer le plus près possible du site d'accrochage de l'antigène (Fig.48B.1). Commercialement, on peut trouver un anticorps secondaire dirigé contre les parties C_L ou C_H (Fig.48B.2 et 3). Cela est très onéreux et parfois cette protéine n'est pas conjuguée au composé permettant de détecter la fixation de la manière voulue (radioactivité, fluorescence...). Vue la quantité d'anticorps secondaires utilisée pour pouvoir élaborer un protocole, on utilise, dans un premier temps, un anticorps secondaire simple. Une fois les paramètres du protocole fixés, on peut utiliser un anticorps dirigé contre les parties $F(ab'_2)$ de l'anticorps primaire. Il faut être conscient que le nombre d'IgG greffés auquel on accède est compris entre le nombre total d'IgG greffés et celui d'IgG fonctionnels.

Nous avons utilisé trois méthodes pour doser les protéines : (i) l'absorption UV nous permet de caractériser la concentration des protéines avant de les greffer ; (ii) le test BCA est un test rapide et simple à mettre en oeuvre, nous l'effectuons systématiquement après chaque greffage. Il mesure la quantité totale de protéines présentes sur les particules ; (iii) le dosage enzymatique quantifie le nombre de

³⁴sur test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

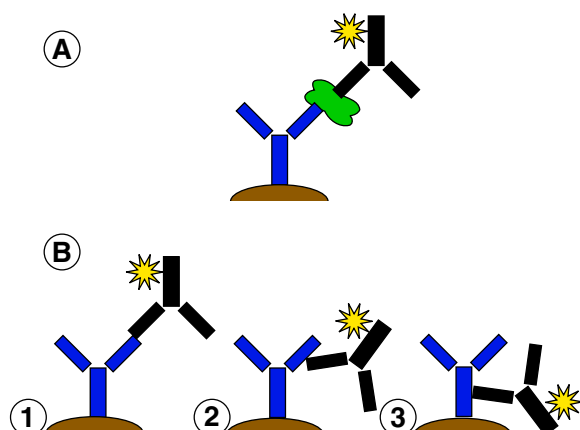


FIG. 48 – A : sandwich Anticorps/Antigène/Anticorps marqué; B : réaction Anticorps primaire/ Anticorps secondaire marqué; 2 : réaction Anticorps primaire/ Anticorps secondaire anti-F(ab'₂) marqué

protéines correctement orientées sur les particules. Ce dernier dosage est plus délicat à mettre en oeuvre.

Toutes les expériences ont été réalisées par Isabelle Génois (LCMD, ESPCI, Paris).

Dosage direct – *Absorption UV*

Si cette méthode est inappropriée pour doser les protéines greffées sur les particules. Elle peut néanmoins être utilisée pour vérifier la quantité de protéines en solution des échantillons que nous recevons.

En ce qui concerne les IgG, la longueur d'onde généralement utilisée est $\lambda = 280 \text{ nm}$ (spécifique des cycles aromatiques). Le coefficient d'extinction à cette longueur d'onde est : $\varepsilon = 1.445 \text{ mL cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. La concentration est déduite à partir de la relation suivante : $A = \varepsilon l C$ où A est l'absorbance, l la largeur de la cuve et C la concentration en mg.mL^{-1} .

Dosage direct – *Bicinchoninic Acid Assay*

Ce dosage quantifié le nombre total de protéines présentes sur les particules magnétiques sans se soucier de leur orientation. Nos conditions d'expériences, notamment le fait que nous utilisons des tensioactifs et des particules magnétiques, peuvent engendrer des erreurs dans le dosage. Il a donc fallu vérifier plusieurs points du protocole fourni avec le test tels que :

- la longueur d'onde à laquelle nous devons lire l'absorbance ;
- la valeur à accorder à une courbe étalon faite avec le standard fourni (BGG) ;
- l'influence de la nature du diluant ;
- l'influence de la présence des particules.

Nous avons également optimisé le protocole afin d'obtenir une meilleure reproductibilité et une meilleure sensibilité.

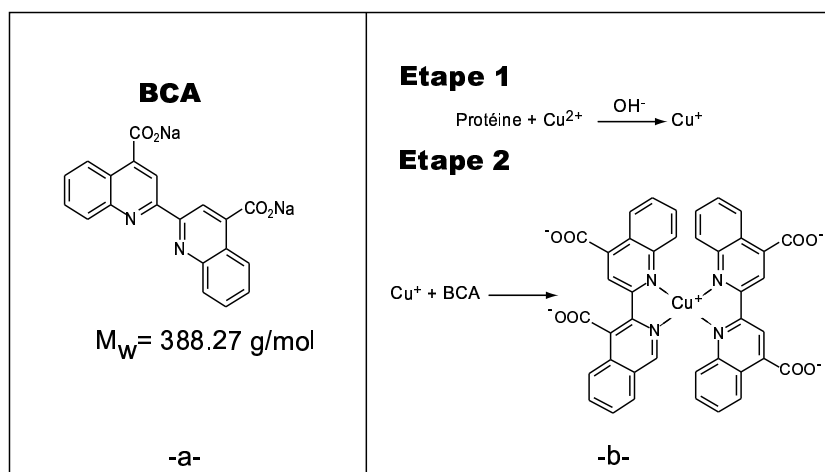


FIG. 49 – Formule développée du BCA et schéma de la réaction

Produits

- BCA Protein Assay Kit (Pierce, Perbio, Prod#23225 ; 144€HT)
- Réactif A (1 L) : carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninic et tartrate de sodium dans 0,1 M d'hydroxyde de sodium (Prod#23223) ;
- Réactif B (25 mL) : solution de sulfate de cuivre à 4% (Prod#23224) ;
- Standard albumin (10×1 mL) : bovine serum albumine à 2,0 mg/mL, 0,05% azidure de sodium.
- BGG (Pierce, Perbio, Prod#23212, 67€HT) ou Bovine Gamma Globuline : standard recommandé pour établir la courbe d'étalonnage, lorsque l'on travaille avec des IgG.
- Particules magnétiques dites de 1^{ère} génération pour lesquelles il semble que l'oxyde de fer est mal encapsulé.
Lot EPN : particules COOH, diamètre 207 nm, $\phi = 3,2\%$ en masse, phase continue : Triton X405 2,1 g/L, NaN_3 0,09% ;
- Particules magnétiques dites de 2^{ème} génération avec l'oxyde de fer correctement encapsulé.
 - (i) *Lot AC13G* : particules COOH, diamètre 308 nm, $\phi = 1\%$ en masse, phase continue PF 127 0,3% en masse, densité de COOH : $390 \mu\text{mol/g}$, susceptibilité $\chi = 39 \text{ emu/g}$, densité des particules $\rho = 2,1 \text{ g/cm}^3$.
 - (ii) *Lot 197-0212b* : particules COOH, diamètre 195 nm, $\phi = 1\%$ en masse, phase continue PF 127 0,3% en masse, NaN_3 0,09%, densité de COOH :

515 $\mu\text{mol/g}$, densité des particules $\rho = 1.86 \text{ g/cm}^3$.

Considérations quantitatives...

Afin de savoir dans quel domaine de concentrations on se situe, il convient de calculer par des considérations géométriques quelle quantité de protéines il faut pour obtenir une monocouche sur les particules.

Considérons une masse m (g) de particules.

Cela représente $N \times 4\pi r^2 \text{ cm}^2$ soit $m \times 4\pi r^2 / \rho v = \frac{3m}{\rho r} \text{ cm}^2$ avec N : le nombre de particules, v : le volume d'une bille, ρ : la masse volumique des particules et r : le rayon d'une bille.

On considère que la quantité d'anticorps donnant une mono-couche ³⁵ varie entre 130 ng/cm² et 650 ng/cm² selon qu'ils sont complètement "couchés" ou complètement "debouts" (Fig.50).

Soit $130 \times \frac{3m}{\rho r} \text{ ng} < \text{quantité IgG} < 650 \times \frac{3m}{\rho r} \text{ ng}$.

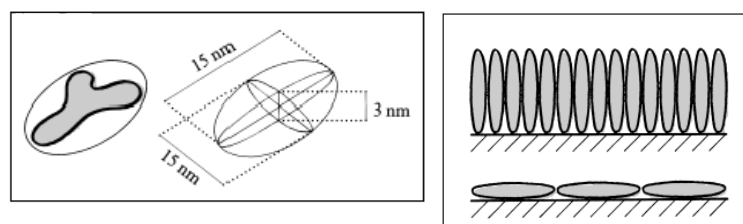


FIG. 50 – La forme Y d'un IgG peut être contenue dans un ellipsoïde de 15 nm de diamètre et 3 nm d'épaisseur (gauche). Représentation des IgG positionnés sur une surface : la densité de molécules varie d'un facteur 5 entre le cas où tous les IgG sont "debouts" et celui où ils sont "couchés" (droite). *Bulletin N°6, NuncTM*.

Si on considère 1 mg de particules :

- du *Lot AC13G* (diamètre $d = 308 \text{ nm}$, densité des particules $\rho = 2,1 \text{ g/cm}^3$). On obtient **12 μg** < quantité IgG < **60 μg** .
- du *Lot 197-0212b* (diamètre 195 nm, $\rho = 1.86 \text{ g/cm}^3$). On obtient **21.5 μg** < quantité IgG < **107.5 μg** .

Le protocole que nous utilisons permet de détecter des concentrations de protéines comprises entre 5 et 250 $\mu\text{g/mL}$. Le volume dans lequel on redisperse les particules avant caractérisation est important : il faut travailler suffisamment concentré (le volume à doser est de 25 μL) et faire en sorte que l'on n'ait pas à utiliser la totalité des particules greffées.

³⁵Bulletin N°6, NuncTM, www.nuncbrand.com

Protocole

Le kit est fourni avec un protocole détaillé suivant la gamme de concentrations en protéine que l'on veut doser et les conditions expérimentales (tubes ou microplaques). Nous utilisons le *Enhanced protocol* qui permet de mesurer des concentrations comprises entre 5 et 250 $\mu\text{g/mL}$.

1. on prépare ce qui est appelé le "réactif de travail" (noté RT) en mélangeant le réactif A avec le réactif B, 50 :1 (v/v). Il faut compter 500 μL de RT par échantillon. Le RT est stable une journée si on le stocke à température ambiante dans un récipient fermé ;
2. On prélève 25 μL de la solution à doser (25 μL de particules dispersées dans un tampon phosphate 10 mM pH=7.3, tween 0.2 % en masse à la concentration souhaitée, afin de se situer dans la gamme de mesure) auxquels on ajoute 500 μL de RT et on mélange ;
3. on laisse ensuite incuber 30 min à 60°C puis on refroidit les tubes ;
4. on place l'échantillon sur un aimant afin de récupérer le surnageant ;
5. on mesure l'absorbance à 562 nm pour chaque tubes *vs.* référence constituée de la solution ayant subi les mêmes étapes mais sans la protéine (*i.e.* 25 μL de particules non greffées).
Il est mentionné que la couleur peut continuer à évoluer même après le refroidissement. Toutefois, la réaction étant lente, on peut lire l'absorbance jusqu'à 10 min après le refroidissement sans engendrer d'erreurs significatives.

6. lors de chaque série de mesure, il faut réaliser une courbe d'étalonnage.
On dilue (avec le même tampon que celui utilisé pour notre échantillon) une solution étalon (de BSA, BGG ou protéine étudiée) afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ et 5 $\mu\text{g/mL}$. On ajoute ensuite la même quantité de particules *non* greffées³⁶ que celle utilisée pour le dosage. On opère ensuite comme décrit précédemment.

On trace alors la courbe d'étalonnage qui va nous permettre de déterminer la concentration de notre échantillon.

Dosage anti-vWF sur chaînes permanentes PAA

Il s'agit ici de doser les anti-vWF IgG greffés non plus sur des particules individuelles mais sur des chaînes de particules. Les particules sont pontées entre elles avec du polyacide acrylique. On greffe ensuite l'IgG sur les fonction COOH

³⁶Quel que soit le lot de particules utilisé, on observe que la teinte du surnageant diffère de celui contenant la même concentration en protéine mais sans les particules. L'oxyde de fer contenu dans les particules réduit également Cu^{2+} .

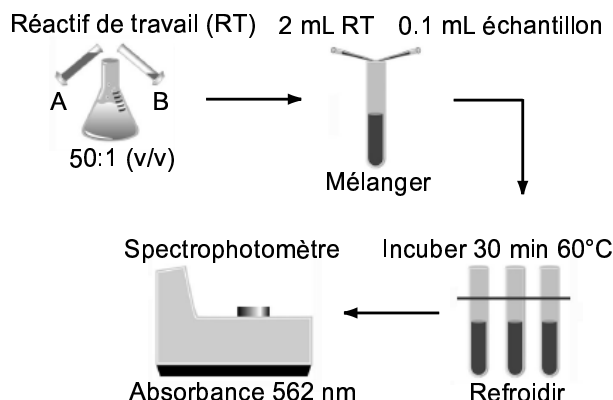


FIG. 51 – Schéma de principe de la méthode BCA

du polymère. Les particules utilisées proviennent du lot V2G. Le protocole est identique au précédent sauf que l'on remplace les particules magnétiques par des chaînes de particules magnétiques

On réalise une courbe de calibration :

- On mélange 25 μL d'échantillon (solution de BGG à différentes concentrations), 500 μL de RT et 1.6 mg de chaînes de particules PAA.
- On laisse incuber 30 min à 60 °C.
- On lit l'absorbance à 562 nm contre une solution ayant subi le même traitement (chaînes de particules, tampon, température) mais sans les protéines.

L'absorbance d'une solution de 1.6 mg de particules greffées avec de l'anti-vWF IgG est de 0.5267 ce qui correspond à une concentration d'IgG de 167 $\mu\text{g/mL}$. Il y a donc 4.2 μg d'IgG greffés sur 1.6 mg de particules soit 2.6 μg IgG/ mg de chaînes particules. Si on considère que le diamètre des particules est de 750 nm et en prenant une densité de 2 g/cm^3 (donnée non fournie), on obtient une densité d'IgG de **65 ng/cm^2** .

Un autre kit basé sur le même principe permet de doser des quantités de protéines plus faibles.

Dosage direct – *micro BCA*

Ce test repose sur le même principe que le précédent mais permet de doser des quantités plus faibles de protéines (0.5 $\mu\text{g/mL}$ - 20 $\mu\text{g/mL}$).

Produits

- Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Perbio, Prod#23235 ; 205€HT)
 - Réactif A (240 mL) : carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, tartrate de sodium dans 0,2 M d'hydroxyde de sodium (Prod#23231) ;
 - Réactif B (240 mL) : Solution d'acide bicinchoninic (4%)(Prod#23232) ;
 - Réactif C (12 mL) : solution de sulfate de cuivre à 4%, pentahydrate (Prod#23234) ;
 - Standard albumin (10×1 mL) : bovine serum albumine à 2,0 mg/mL, 0,05% azidure de sodium (Prod#23209).
- BGG (Pierce, Perbio, Prod#23212, 67€HT) ou Bovine Gamma Globuline : standard recommandé pour établir la courbe d'étalonnage, lorsque l'on travaille avec des IgG.

Protocole

Le kit est fourni avec un protocole détaillé que nous avons adapté au dosage des protéines présentes à la surface de particules magnétiques :

1. On prépare ce qui est appelé le “réactif de travail” (noté RT) en mélangeant le réactif A, le réactif B et le réactif C 50 : 48 : 2 (v/v/v). Il faut compter 300 μL de RT par échantillon. Le RT est stable plusieurs jours si on le stocke à température ambiante dans un récipient fermé ;
2. on prélève 300 μL de la solution à doser (particules magnétiques greffées et lavées trois fois dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7.3 ; tween 20 0.2 % en masse) auxquels on ajoute 300 μL de RT et on mélange ;
3. on laisse ensuite incuber 1 heure à 60°C puis on refroidit les tubes ;
4. on mesure l'absorbance à 562 nm pour chaque tubes *vs.* référence constituée de la solution ayant subi les mêmes étapes mais sans la protéine (soit avec des particules non greffées).
Il est mentionné que la couleur peut continuer à évoluer même après le refroidissement. Toutefois, la réaction étant lente, on peut lire l'absorbance jusqu'à 10 min après le refroidissement sans engendrer d'erreurs significatives ;
5. lors de chaque série de mesure, il faut réaliser une courbe d'étalonnage.
On dilue (avec le même tampon que celui utilisé pour notre échantillon) une solution étalon (de BSA, BGG ou protéine étudiée) afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$,

5 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ et 0.5 $\mu\text{g/mL}$. On ajoute ensuite la même quantité de particules *non* greffées que celle utilisée pour le dosage. On opère ensuite comme décrit précédemment.

On trace alors la courbe d'étalonnage qui va nous permettre de déterminer la concentration de notre échantillon.

Dosage des particules greffées avec l'IgG de lapin anti-vWF

Nous avons dosé 1 mg de particules greffées (lot EPN, ADEMTECH) avec des IgG de lapin anti-vFW dispersées dans 300 μL de tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, tween 20 0.2 % en masse. L'absorbance est alors de 0.205. Ce signal correspond à 5.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'IgG soit 1.7 μg d'IgG par mg de particules. On en déduit alors qu'il y a environ 70 IgG par particules magnétiques.

Dosage indirect – Dosage enzymatique

Il s'agit ici d'un dosage indirect : on fait réagir un anticorps secondaire marqué avec une enzyme afin de détecter la présence des protéines greffées sur les particules. Ce dosage permet d'estimer la capacité des IgG greffés à réagir avec l'anticorps secondaire (en d'autres termes, il dose le nombre d'IgG correctement orientés). Pour obtenir la réelle capacité à se lier des IgG greffés, l'idéal serait de faire ces dosages avec l'antigène marqué contre lequel les IgG sont dirigés. Ce travail a été effectué en collaboration avec Zuzana Bilkova (Assist. Prof., Department of Biological and Biochemical Sciences Faculty of Chemical Technology, Univerzity of Pardubice).

Principe

Une enzyme³⁷ réagit avec un substrat³⁸ pour donner un produit qui peut être coloré, fluorescent ou luminescent.

Deux enzymes sont principalement utilisées dans les immuno-tests :

- **Horseradish peroxidase** (ou HRP) : petite glycoprotéine (44 kDa) issue du raifort ;
- **Alkaline phosphatase** : glycoprotéine dimère (140 kDa) provenant principalement de l'intestin de veau.

Les tests enzymatiques sont largement utilisés en raison de leur simplicité et du fort signal de la réaction enzyme/substrat, ce qui permet la détection de

³⁷Protéine présentant les propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

³⁸Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme. Toute molécule qui entre dans une réaction enzymatique et est définitivement modifiée est appelée substrat

faibles concentrations d'analytes.

Nous avons choisi de travailler avec la HRP et l'OPD (o-phenylènediamine dihydrochloride), molécule qui permet une détection colorimétrique de la transformation du substrat (H_2O_2) via un spectrophotomètre (Lambda 35 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer Instruments).

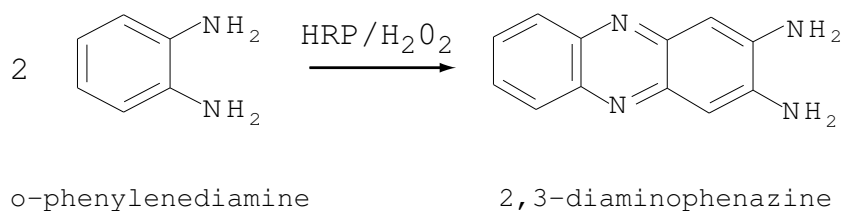
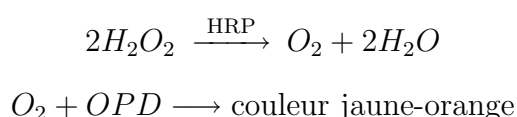


FIG. 52 – Schéma de la réaction colorimétrique avec l'OPD.

Présentation de la HRP

La HRP possède 4 lysines libres qui peuvent être utilisés pour la coupler sans diminuer son activité. On peut aussi la conjuguer avec du sodium periodate via sa chaîne glycosylée. Un protocole en deux étapes avec du glutaraldéhyde peut parfois être utilisé³⁹. On trouve sur le marché une large variété de ligands couplés à la HRP, ce qui permet de s'affranchir du marquage (simple mais difficile à caractériser et à purifier).

La peroxidase oxyde l'eau oxygénée qui va alors réagir avec l'OPD pour donner un produit jaune orangé (Fig. 52) suivant la réaction :



Plus concrètement, on fait réagir en excès un anticorps secondaire conjugué à la HRP sur les particules greffées. On lave afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaires et on met le complexe particules magnétiques anticorps primaire/anticorps secondaire-HRP en présence d'eau oxygénée et d'OPD. On lit ensuite l'absorbance à 440 nm (Annexe 1).

Produits

Nous avons travaillé sur des particules magnétiques (EPN, AC13G ADEME-TECH)) greffées avec un IgG polyclonal, IgG de lapin anti-vWF humain (suivant

³⁹The Protein Protocols Handbook 2nd edition edited by John M. Walker, Humana Press

un protocole développé par Catherine Rouzeau).

Goat anti-rabbit IgG-HRP : (Sigma-Aldrich A6154, 1mL :78.05 €HT) pour doser le rabbit anti-vWF IgG (Diagnostica Stago). Dès réception, le produit est aliquoté par 20 μ L à 0,8 mg/mL puis congelé ;

Aucune indication n'est donné quant au nombre de HRP greffées par IgG.

OPD : ce produit est vendu sous différentes formes (liquide ou solide). Il est préférable de l'utiliser sous forme de pastilles car il est cancérigène. Nous utilisons des tablettes de 5 ou 10 mg (Sigma, ref P3804 166.50 € HT 100 tablettes , P8287 169.60 €HT 100 tablettes) ne contenant que de l'OPD (certaines tablettes contiennent des sels et de l'urée). Stockage dans le réfrigérateur.

H₂O₂ : solution à 3% (masse/masse) (Sigma, ref H-6520). Stockage dans le réfrigérateur.

Tampon S : tampon utilisé pour la réaction enzyme/substrat. Nous utilisons un tampon phosphate 10 mM, pH= 7,3, tween 20 0.2% en masse. Il est préparé sans NaN₃ (car ce dernier inhibe la HRP) et stocké à 11°C.

Phases de la réaction

On distingue 4 phases (Fig.53) :

- une phase très brève (non observable) au cours de la laquelle la vitesse de réaction est croissante. Les molécules de substrat se lient avec l'enzyme : la concentration du complexe enzyme-substrat augmente ;
- lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules de substrat, la vitesse de la réaction est maximale (appelée vitesse initiale) et reste constante tant que la concentration du substrat est grande devant celle du produit.
- lorsque la concentration du produit augmente, la réaction inverse commence à concurrencer celle que l'on mesurait : la vitesse diminue ;
- la dernière phase correspond à l'équilibre : la vitesse de transformation inverse devient égale à celle de départ, les concentrations ne changent plus.

Remarque : la vitesse généralement étudiée est la vitesse initiale.

Point de départ

On doit garder à l'esprit que l'on veut déterminer la quantité d'IgG greffées sur les particules magnétiques. On greffe généralement 1 mg de particules magnétiques. On estime (par un simple raisonnement géométrique) qu'une monocouche est constituée de 20 μ g d'IgG par mg de particules faisant 315 nm de diamètre. Sachant qu'il faut travailler en excès d'anticorps secondaires cela veut dire que l'on doit utiliser 20-200 μ g d'IgG-HRP, ce qui est énorme. Il faut donc travailler sur une fraction de l'échantillon qui vient d'être greffé. Cette fraction ne doit cependant pas être trop petite pour des raisons de reproductibilité. Pour cela, on

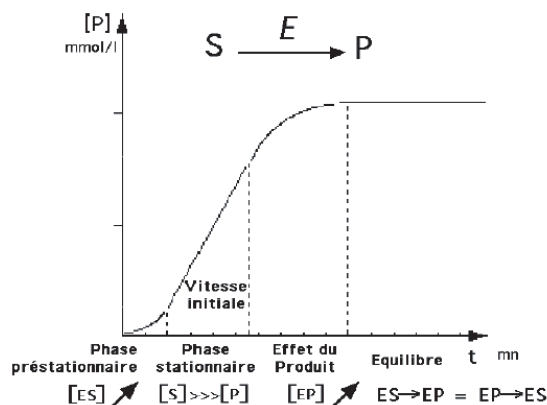


FIG. 53 – Schématisation des différentes phases d'une réaction enzymatique. S : substrat, P : produit, E : enzyme, E-S : complexe enzyme-substrat (Cours enzymologie Pr. A. Raisonier <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/EEbioch/>)

s'est fixé de travailler sur 40 μL de particules à 0,1% en masse et d'utiliser 1,6 μg d'anticorps secondaires pour la détection (multiple de la concentration mère).

Nous avons étudié l'influence du tampon S, le rapport des quantités substrat/enzyme sur les cinétiques de réaction afin de déterminer des conditions opératoires "pratiquables" (notamment pour pouvoir arrêter la réaction). L'efficacité de l'arrêt de la réaction, les longueurs d'onde de lecture ainsi que l'influence de la filtration des solutions avant leur passage dans le spectrophotomètre ont également été étudiées. Nous avons ainsi établi le protocole suivant :

Protocole

1. Préparation de 5 mL de substrat (noté S) : 5 mg d'OPD, H_2O_2 0,03% en volume, tampon S. Il faut le préparer au dernier moment car il peut réagir avec l'oxygène de l'air ;
2. décongélation d'un aliquot d'IgG-HRP et dilution à la concentration souhaitée. La solution diluée ne doit être gardée que 1 à 2 jours maximum : nous décongelons à chaque fois un nouvel aliquot ;
3. on mélange 40 μL de particules magnétiques greffées ($\phi=0.1$ en masse) avec 100 μL de la solution diluée au 1/50 d'enzyme. On complète à 800 μL avec du tampon S ;
4. on laisse incuber 30 minutes dans le noir sur roue à température ambiante ;
5. on ajoute ensuite 200 μL de substrat S ;
6. on arrête la réaction au bout de 1.5 minutes en ajoutant 50 μL de H_2SO_4 à 3M.
7. on prélève le surnageant que l'on place dans une cuve de spectroscopie ;
8. on lit l'absorbance de cette solution à 490 nm⁴⁰ vs. une référence constituée

⁴⁰Si on n'arrête pas la réaction, la lecture se fait à 440 nm.

du surnageant de l'échantillon suivant : 40 μL de particules, 760 μM de tampon S, 200 μL de substrat S et 50 μL de $\text{H}-2\text{S0}_4$.

En opérant le même dosage pour des quantités croissantes de particules greffées, nous avons vérifié que nous étions bien en excès d'anticorps secondaires. Le seul point que nous n'avons pas optimisé est le temps de réaction particules greffées/anticorps HRP et la limitation des interactions non-spécifiques. Pour bien faire, il faudrait posséder un spectrographe avec un lecteur de plaques afin d'étudier rapidement un grand nombre de paramètres.

Pour remonter à une concentration de protéine à partir de la valeur de l'absorbance, il faut effectuer une courbe d'étalonnage, le jour même de l'expérience dans les mêmes conditions.

Annexe 5 : Détermination de la longueur du lien IgG/vWF/IgG

Principe

La *Magnetic Chaining Technique* (MCT) permet de mesurer directement l'interaction entre deux particules colloïdales magnétiques.

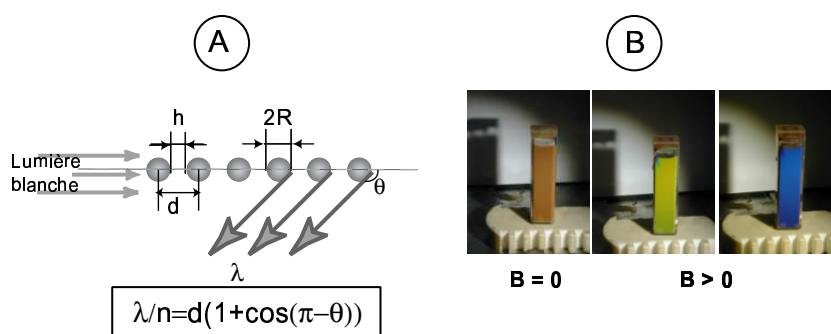


FIG. 54 – A : illustration de la diffraction de la lumière par une chaîne de particules ; B : émulsion magnétique soumise à différentes intensités du champ magnétique - Visualisation de la distance entre particules : plus le champ magnétique est fort et plus les particules se rapprochent, l'onde diffractée passe ainsi du vert au bleu.

Soumises à un champ magnétique, les particules s'organisent sous forme de chaînes. L'espacement entre les particules dépend (i) de l'intensité du champ magnétique externe et (ii) de l'intensité des forces répulsives entre particules. Le système est analogue, en présence du champ magnétique, à un cristal unidimensionnel et diffracte la lumière à des longueurs d'onde de valeur déterminée par la condition de Bragg (Fig.54).

La distance finale entre particules résulte d'un équilibre entre les forces attractives (interactions magnétiques en présence d'un champ, interactions spécifiques, interactions de Van der Waals) et répulsives (électrostatiques, stériques). La distance d'équilibre est atteinte, à chaque incrémentation de la valeur du champ, lorsque la force répulsive compense exactement la force attractive. Sa mesure, par

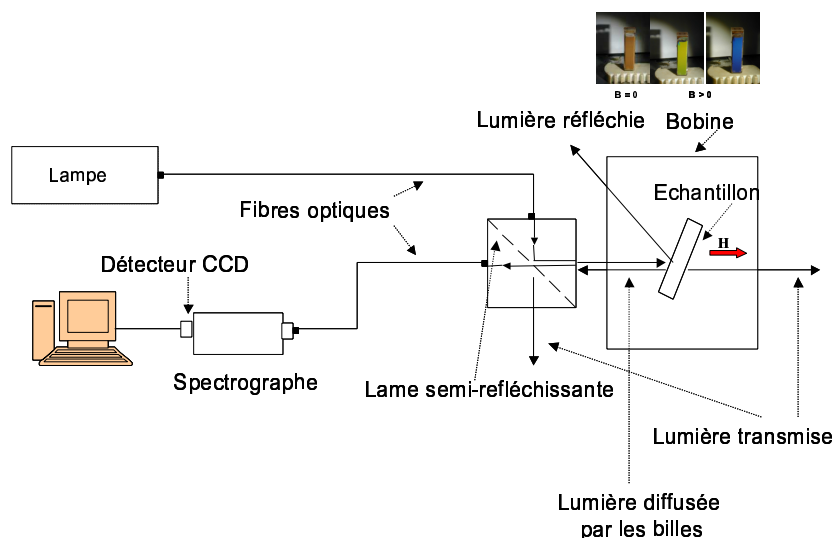


FIG. 55 – Montage de la *Magnetic Chaining Technique* : la lumière émise par une lampe à vapeur de xénon est acheminée vers l'échantillon via une fibre optique. L'échantillon est placé au coeur d'une bobine dont on peut faire varier le champ. La lumière rétrodiffusée par l'échantillon est ensuite analysée par un spectrographe constitué d'un détecteur CCD, d'un réseau et d'une carte interface logée dans un bus ISA de l'ordinateur qui fait l'acquisition et le traitement des données. On utilise un miroir semi-réfléchissant qui permet de séparer le faisceau incident du faisceau rétro-diffusé.

diffraction de la lumière, en fonction du champ appliqué, permet de construire le profil de la force de répulsion en fonction de la distance de séparation.

Pour une bonne précision et une bonne reproductibilité, il faut des particules extrêmement calibrées. Leur taille doit permettre l'observation dans le visible de la lumière diffractée, soit 150-300nm de diamètre. Elles doivent par conséquent être fortement magnétiques pour pouvoir s'aligner sous des champs raisonnables (50-100 mT).

Ces expériences ont été faites avec l'aide de Rémi Dreyfus (doctorant, ESPCI) qui a réalisé le montage de la *Magnetic Chaining Technique* (Fig.55) au laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés (ESPCI, Paris).

Matériel et Méthode

Matériel

- Lampe à arc à vapeur de xénon, modèle série Q, 75 W, Oriel ;
- spectrographe à champ plan, modèle MS125, Oriel ;
- bobine, constituée de spires de fil de cuivre émaillé, fabriquée sur mesure par TSR (Pessac). Le champ magnétique B (mT) varie en fonction de l'intensité

- I ($0 < I < 15$ A) selon : $B(mT) = 9.2404 \times I(A)$;
- alimentation de la bobine : modèle SDL 61-HR 60.18 B, option IEEE, Convergie ;
 - logiciel d'acquisition des spectres : Linespec, Oriel ;
 - l'échantillon est placé dans des cuves plastiques (A 1218090, Labosi Fisher).

Méthode

On mesure le signal en réflectance soit :

$$R = \frac{I_{\text{mesure}} - I_{\text{bruit de fond}}}{I_{\text{référence}} - I_{\text{bruit de fond}}}$$

$I_{\text{bruit de fond}}$: intensité quand la lampe est éteinte

$I_{\text{référence}}$: intensité à champ magnétique nul. On s'affranchit ainsi du bruit.

Pour chaque mesure, on choisit :

- un temps de pause en ms. Ce temps est choisi en fonction de la turbidité de l'échantillon, donc de sa concentration,
- le nombre de coups sur lequel on accumule.

Le traitement des données est effectué à l'aide du logiciel Igor Pro. Il permet de tracer les courbes de réflectance en fonction de la longueur d'onde et recherche le maximum de chaque courbe. On lui fait calculer la force attractive en sommant la force magnétique et la force de van der Waals ($F(d) = -1.202 \frac{3m^2}{2\pi\mu_0 d^4} - \frac{A_H R}{12(d - 2R)^2}$, d étant la distance coeur à coeur en particules de rayon R , A_H est la constante de Hamaker, m est le moment magnétique d'une particule, μ_0 est la perméabilité du vide). On trace ensuite cette force (pN) en fonction de la distance d (nm).

Echantillons

Particules non greffées : lot FPN (ADEMTECH), particules fonctionnalisées COOH, diamètre 207 nm, $\phi = 3,2\%$ en masse, phase continue : Triton X405 2,1 g/L, NaN_3 0,09%. Les particules sont lavées dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, tween 0.2% en masse ($\phi = 0.1-0.01\%$ en masse). Les particules sont filtrées (filtre Sartorius, 1.2 μm) et placées dans une cuve de spectroscopie en plastique (V=500 μL).

Particules greffées : les particules précédentes ont été greffées avec des IgG anti-vWF (cf. Annexe 3). Elles sont faiblement greffées : il y a environ 70 IgG par particule (soit 1 IgG/ 2000 nm²). Elles sont stockées à une concentration de $\phi=1\%$ mass dans du tampon phosphate 10 mM, tween 20 0.2% en masse NaN_3 0.02% en masse. Les particules sont lavées dans un tampon phosphate 10 mM,

pH=7.3, tween 0.2% en masse ($\phi = 0.1-0.01\%$ en masse). Les particules sont filtrées (filtre Sartorius, $1.2\ \mu\text{m}$) et placées dans une cuve de spectroscopie en plastique ($V=500\ \mu\text{L}$).



FIG. 56 – Particules magnétiques, greffées avec des anti-vWF IgG, en présence d'un champ magnétique.

Déroulement d'une expérience

L'échantillon (dans une cuve de spectroscopie) est placé au coeur de la bobine. On règle l'incidence du faisceau afin de minimiser les réflexions parasites sur les parois de la cuve. On recouvre ensuite la bobine d'un drap noir. On mesure l'intensité réfléchie quand la lampe est éteinte, puis celle quand le champ magnétique est nul. On fait ensuite varier l'intensité du champ. *Le champ est annulé entre chaque incrément* pour redisperser les particules.

Expérience

Le but de l'expérience est de mesurer la longueur du lien anti-vWF IgG/vWF/anti-vWF IgG décrit au Chap.III.2. On mesure les profils de forces suivants :

- profil de forces des particules non greffées ;
- profil de forces des particules greffées ;
- profil de forces en présence du lien.

Profil de forces des particules non greffées

On a choisi un temps de pause de 20 ms et un nombre de coups égal à 100.

On a effectué plusieurs fois la mesure du profil de forces entre particules non greffées (particules fonctionnalisées COOH, lot FPN, ADEMTECH) en remplaçant à chaque fois la cuve au coeur de la bobine afin de vérifier la reproductibilité de la mesure (et ce sur deux jours). Les profils obtenus sont représentés Fig.58. L'écart maximal entre deux profils est de 2 nm.

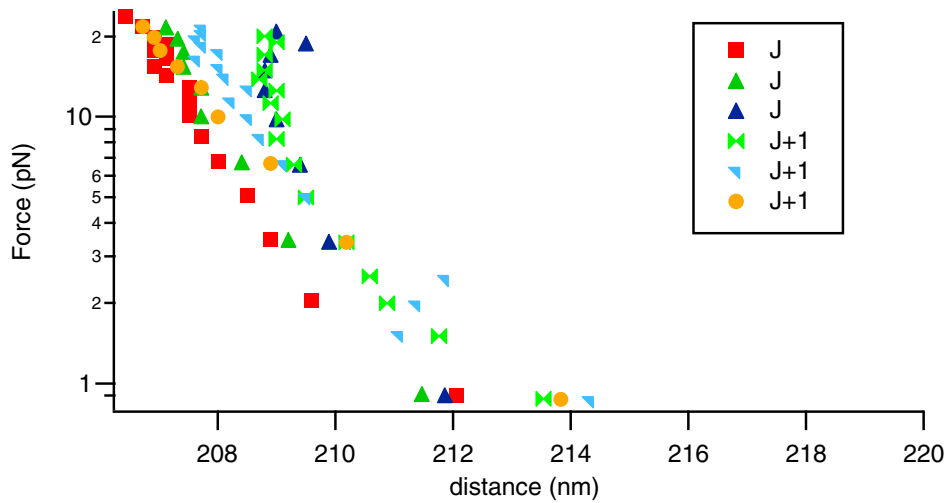


FIG. 57 – Profil de forces de particules magnétiques fonctionnalisées COOH (lot FPN, Ademtech) dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, Tween 20 0.2% en masse. Même échantillon remplacé au coeur de la bobine entre chaque expérience (le jour J, le lendemain J+1).

Profil de force des particules greffées

De même que précédemment nous avons mesuré le profil de force entre particules greffées avec des IgG anti-VWF. Nous avons répété les mesures afin de s'assurer de leur reproductibilité (Fig.58).

Quand on compare ces profils avec ceux obtenus avec les particules non greffées (Fig.59), on constate qu'ils sont pratiquement superposés ce qui est cohérent avec le fait que les particules portent très peu d'IgG.

Profil de force des particules greffées en présence du lien

Le vWF est contenu dans du plasma humain (vWF Calibrator, Diagnostica Stago, 00520) que l'on chauffe à 37°C.

On mélange 250 μL de particules greffées filtrées ($\phi=0.4\%$ en masse) avec 168 μL de tampon phosphate 10 mM pH=7.3 et 85 μL de plasma ($4\mu\text{g.mL}^{-1}$ de vWF). La force ionique de la phase continue est alors de 40 mM (force ionique d'un tampon phosphate 10 mM (en phosphate) : 20 mM, force ionique du plasma : 150 mM). On place le mélange dans une cuve de spectroscopie au coeur d'une bobine et on mesure la réflectance en fonction du champ magnétique appliqué. On augmente progressivement le champ en l'annulant entre chaque incrémentation. Pour identifier le moment où les chaînes deviennent permanentes, (i) on observe au microscope l'échantillon (ii) on regarde comment évolue la position du maximum de la courbe de réflectance, quand on annule le champ entre chaque incrémentation.

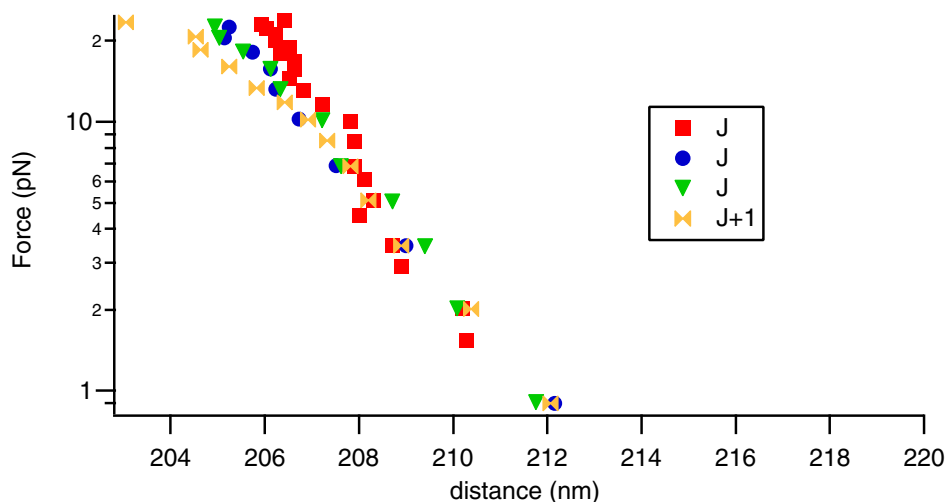


FIG. 58 – Profil de forces de particules magnétiques greffées avec des IgG anti-vWF (lot FPN, Ademtech) dans un tampon phosphate 10 mM, pH=7.3, Tween 20 0.2% en masse. Même échantillon remplacé au coeur de la bobine entre chaque expérience (le jour J, le lendemain J+1).

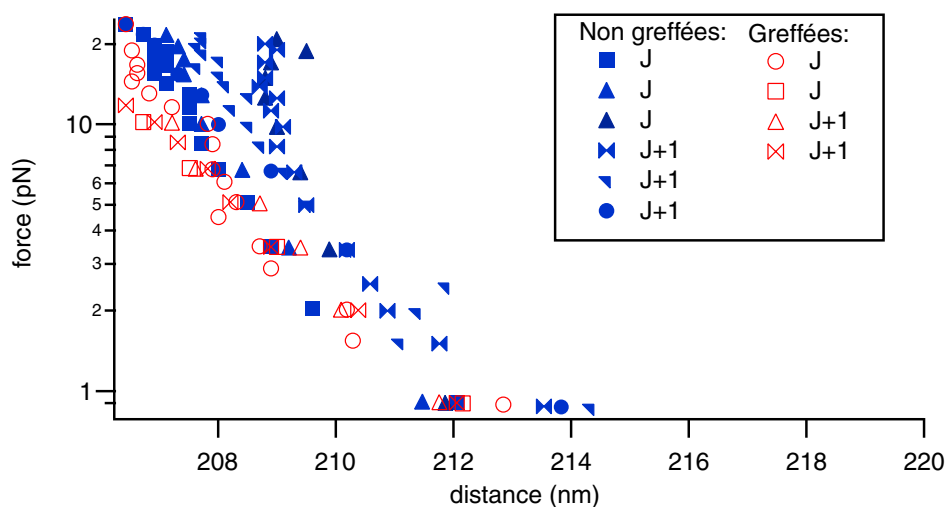


FIG. 59 – Comparaison des profils de forces de particules greffées et non greffées.

Les profils de forces des particules non greffées, greffées et en présence du vWF sont reportés sur la Fig.60. On peut alors déterminer la longueur du lien : la distance h représente la distance entre particules, centre à centre. En l'absence du vWF, le profil force/distance nous permet d'estimer le diamètre "coeur dur" : h_c . En présence du vWF, on note h la distance à partir de laquelle il y a formation

de chaînes permanentes. La longueur l du lien est $h - h_c$ soit :

$$l = 20 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$$

Si on ajuste le profil de force des particules en présence du vWF par l'équation de répulsion électrostatique ($F(d) \propto \exp(-\kappa(d - 2a))$ avec a le rayon des particules et κ l'inverse de la longueur de Debye), on trouve une longueur de Debye de 4.9 nm ce qui correspond à une force ionique de 4 mM. Or la force ionique de la phase continue est de 40 mM. Les répulsions ne sont donc pas uniquement d'origine électrostatique. L'ajout du VWF crée donc des forces répulsives à longues distances d'origine stérique.

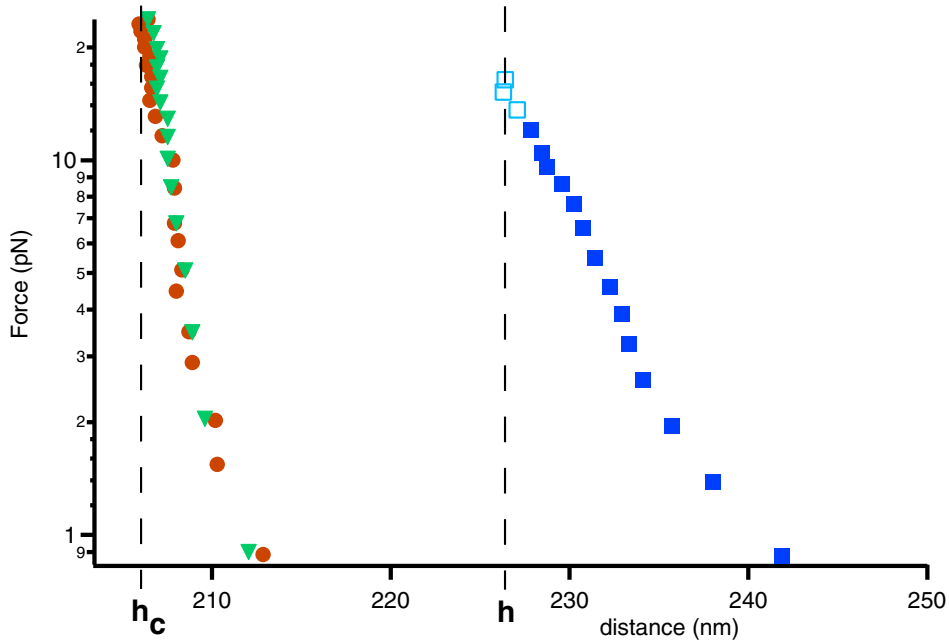


FIG. 60 – Profil de forces : ○ : particules carboxyliques dans un tampon phosphate 20 mM pH=7, △ : particules greffées avec l'IgG (anti-vWF) dans un tampon phosphate 20 mM pH=7, ■ : en présence de vWF, □ : lorsque les chaînes deviennent permanentes.

Annexe 6 : Fabrication de canaux en PDMS

Nous utilisons le principe de la lithographie “molle” afin de fabriquer des canaux en PDMS (poly(diméthylsiloxane), $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, SylgardTM 184 Dow CORNING) dont la hauteur varie entre 50 et 500 μm . Cela consiste à *répliquer* des structures par *moulage* (Fig.61) :

Réalisation d’un moule Nos canaux sont de simples canaux droits épais ($>50\mu\text{m}$). Cela ne nécessite donc pas la confection d’un moule par les techniques traditionnelles (gravure de silicium, photolithographie utilisant un polymère photosensible comme le SU8). Nous déposons sur une lame de microscope des couches de ruban adhésif. Le nombre de couches dépend de la hauteur souhaitée du canal sachant que l’épaisseur du ruban adhésif que nous utilisons est de 50 μm . A l’aide d’un scalpel nous découpons ensuite la forme du canal puis nous retirons l’excès de ruban adhésif. Le rapport d’aspect doit être inférieur à 20 (largeur/hauteur) sinon les canaux en PDMS risquent de s’effondrer. Cette méthode permet d’obtenir facilement (sans avoir recours à une salle blanche) et rapidement des canaux simples ;

Versement du PDMS Le PDMS est mélangé vigoureusement avec un agent réticulant (en proportions de 10 pour 1). Lors du mélange, de nombreuses bulles d’air sont emprisonnées, il faut alors les chasser par mise sous vide à l’aide d’une cloche à vide. Le mélange est versé sur le moule et le tout est mis à l’étuve ($\simeq 65^\circ\text{C}$) pendant au moins deux heures. Pendant cette période, le PDMS réticule ;

Démoulage Le PDMS, devenu solide, se demoule facilement. On obtient alors la structure du moule en négatif ;

Connections A l’aide d’un emporte-pièce nous perçons des trous aux extrémités du canal. Nous y insérons ensuite d’un côté un tube de PTFE (39240 Fisher, $0.30 \times 0.76\text{ mm}$), de l’autre un capillaire de silice (Polymicro technologie, diamètre externe 340 μm , diamètre interne 180 μm). Afin d’assurer l’étanchéité autour de ces tubes, on ajoute une colle silicone (3140 RTV Dow CORNING) et on laisse durcir une nuit ;

Scellement Nous utilisons des lamelles de microscopes rondes (diamètre : 42

mm ; épaisseur : 0.17 mm, Merck Eurolab). Après traitement d'une lamelle et du moulage en PDMS au plasma à oxygène, ces deux objets adhèrent très fortement entre eux.

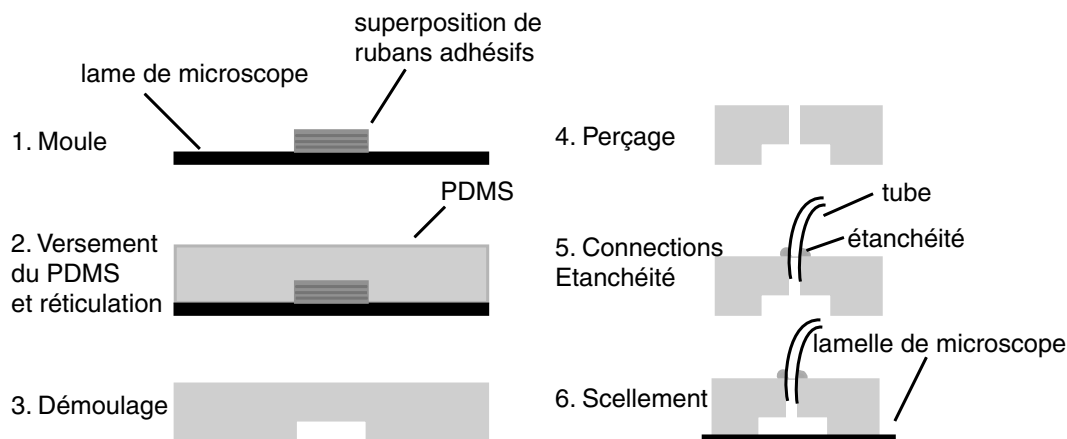


FIG. 61 – Lithographie molle. Illustration des différentes étapes.

Remarque : le PDMS est biocompatible et inerte chimiquement. Sa transparence dans le visible permet de visualiser l'intérieur des canaux. C'est un élastomère, ce qui facilite le démoulage et l'étanchéité des connections microfluidiques, en épousant la forme des tubes de transport de fluide. Il est perméable aux gaz, ce qui facilite le remplissage des canaux. Ce produit est de faible coût et permet un prototypage rapide. Tous ces avantages font du PDMS un produit largement utilisé pour la confection de micro-canaux.

Annexe 7 : Bobines magnétiques

Lors de ce travail de thèse, deux types de montages comportant des bobines magnétiques ont été utilisés.

Au Chapitre 3 nous avons utilisé 4 bobines montées sur un microscope droit (Fig.62) pour étudier la flexibilité des filaments magnétiques. Ces bobines permettent d'obtenir des champs magnétiques dans le plan de la lame d'observation et de directions perpendiculaires (voir paragraphe III.3.1). Les plans de ces bobines sont présentés Fig.64.

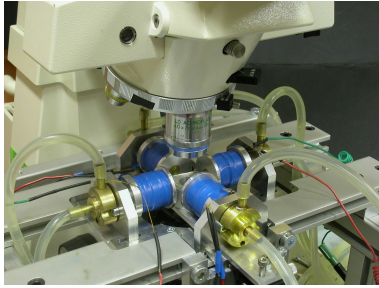
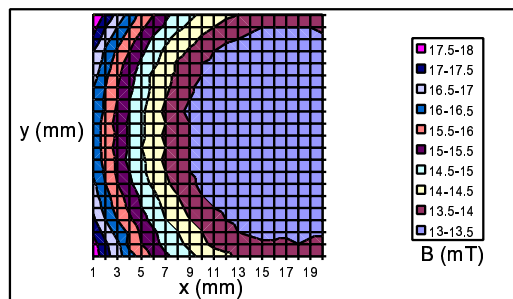


FIG. 62 – Montage utilisé pour étudier la flexibilité des filaments magnétiques. Réalisation Patrice Jenffer (Laboratoire PMMH, ESPCI, Paris).

Au Chapitre 4 nous avons utilisé une bobine posée sur la platine d'un microscope inversé afin de réaliser une matrice de séparation magnétique pour le tri de cellules en microcanaux. La direction du champ magnétique est perpendiculaire à la lame d'observation. L'intensité du champ magnétique varie en fonction de la position dans la bobine. Dans le plan d'observation (x,y), le champ est homogène sur 1.8 cm (Fig.63), ce qui correspond à la longueur de nos canaux.

FIG. 63 – Variation de l'intensité du champ magnétique en fonction de la position dans le plan (x,y) au coeur de la bobine. Mesures réalisées avec Charlie Gosse (Laboratoire de Photonique et Nanostructures, Marcoussis).



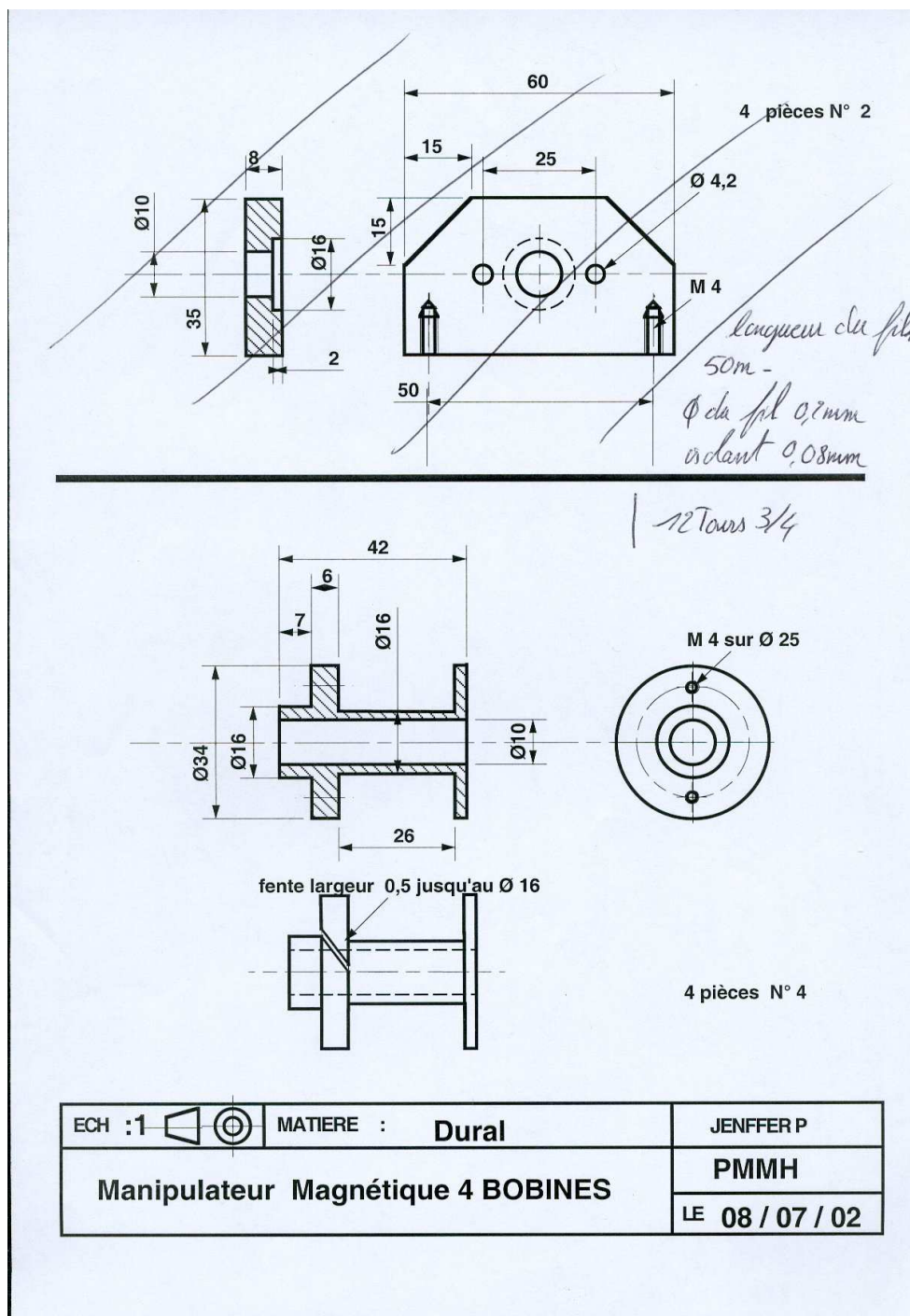


FIG. 64 – Plan d'une des quatre bobines utilisées dans le Chapitre 3. Le bobinage est constitué de 12.75 tours de fils de diamètre 0.2 mm (avec un isolant de 0.08 mm). La longueur totale du fil est de 50m. L'intensité du champ magnétique (B) varie avec l'intensité appliquée (I) comme $B(mT) = 2.9 \times I(A)$. Conception et réalisation Patrice Jenffer (Laboratoire PMMH, ESPCI, Paris).

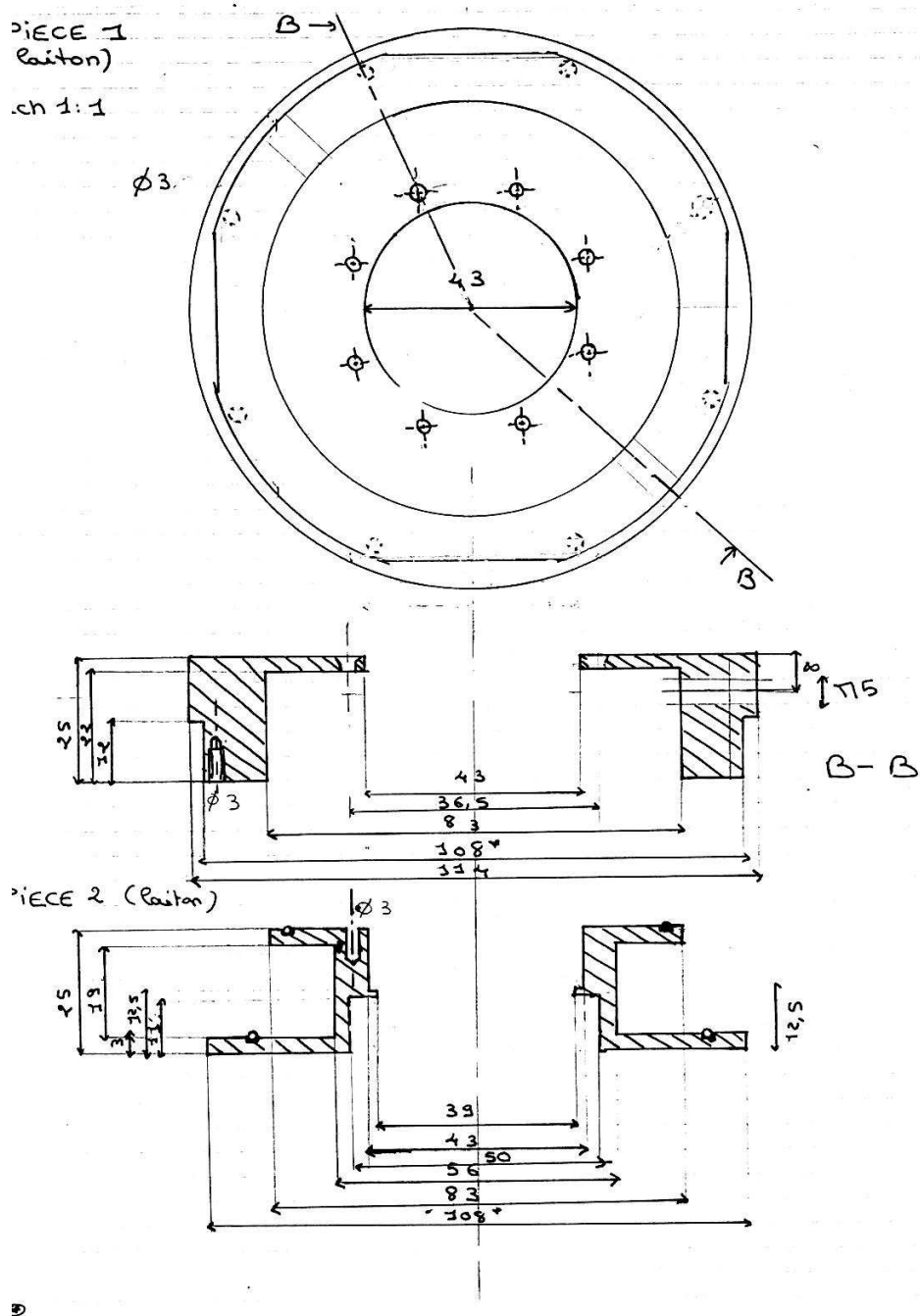


FIG. 65 – Plan de la bobine utilisée au Chapitre 4. Le bobinage est effectué avec du fil de cuivre de 0.75 mm de diamètre ($R=1.4 \Omega$). L'intensité du champ magnétique (B) varie avec l'intensité appliquée (I) comme $B(mT) = 5.9I(A)$. Conception Cécile Goubault ; réalisation Michel Petit (Institut Curie, Paris).

Colloïdes magnétiques : auto-organisation et applications biologiques

Magnetic colloids : self-organization and biological applications

— Cécile Goubault —

Résumé

Ce manuscrit présente l'étude de latex magnétiques auto-organisés.

Dans un premier temps, l'obtention de filaments magnétiques, composés d'assemblages linéaires et permanents de particules magnétiques, est présentée. Ces objets nouveaux introduisent une méthode originale pour sonder la flexibilité à l'échelle moléculaire. Sous champ, ils adoptent une configuration métastable : ils se plient en forme d'épingle à cheveux. A partir de la mesure macroscopique de leur rayon de courbure, corrélée à la mesure par diffusion de la lumière de la longueur du lien, la rigidité de flexion de ce dernier peut être déduite. La modélisation de ce phénomène est aussi décrite.

Enfin, l'organisation de ces filaments, dans des microcanaux, constitue une nouvelle matrice de séparation que l'on a cherché à appliquer, ici, au tri cellulaire. L'obtention d'un réseau de pas contrôlé, l'accrochage des filaments à la paroi, leur décoration par des anticorps spécifiques sont détaillés. Enfin la possibilité de procéder à une chromatographie des cellules est introduite.

Ces nouveaux objets ouvrent un champ d'applications dans le domaine des laboratoires sur puce.

Mots clefs Colloïdes magnétiques, auto-organisation, filaments magnétiques, flexibilité, tri cellulaire, laboratoires sur puce.

Abstract

This manuscript introduces the study of self-assembled magnetic latexes.

First, we present a method to obtain magnetic filaments made of magnetic particles and linkers. These objects provide a new micromechanical approach to probe bending rigidity at the molecular scale. Under a magnetic field, they adopt a hairpin configuration. Measuring the hairpin curvature as a function of the field intensity and the linker length allows us to deduce the linker bending rigidity.

Second, these filaments can be self-organized in a microchannel to provide a new matrix for cell sorting. Control of the spacing between filaments, anchoring, and fonctionnalization with specific antibodies are described, together with the feasibility for performing cell chromatography with the system.

These new objects introduce a wide field of very promising biomedical applications e.g. for lab-on-chip devices.

Keywords *Magnetic colloids, self-organization, magnetic filaments, flexibility, cell sorting, lab-on-chip.*