



**HAL**  
open science

# Chromatographie cellulaire d'affinité : étude expérimentale des mécanismes de capture spécifique et implications pour un développement industriel

Julie Bouchon

► **To cite this version:**

Julie Bouchon. Chromatographie cellulaire d'affinité : étude expérimentale des mécanismes de capture spécifique et implications pour un développement industriel. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066335 . tel-01262031

**HAL Id: tel-01262031**

**<https://theses.hal.science/tel-01262031>**

Submitted on 26 Jan 2016

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre

*Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés*

## **Chromatographie cellulaire d'affinité : étude expérimentale des mécanismes de capture spécifique et implications pour un développement industriel**

Par Julie Brouchon

Thèse de doctorat de Physico-Chimie

Dirigée par Jean Baudry

Soutenue publiquement le vendredi 11 septembre 2015 devant le jury composé de :

|                           |  |                    |
|---------------------------|--|--------------------|
| Mme Valérie Pichon        | Professeur, UPMC                       | Examinatrice       |
| M. Fernando Leal Calderon | Professeur, INP Bordeaux               | Rapporteur         |
| Mme Annie Viallat         | Directrice de Recherche, INSERM        | Rapporteur         |
| M. Jérôme Bibette         | Professeur, ESPCI ParisTech            | Co-encadrant       |
| M. Jean Baudry            | Chargé de Recherche, CNRS              | Directeur de thèse |
| M. Cavallari Marco        | Docteur Ingénieur, Bertin Technologies | Examineur          |
| M. Luc Douay              | PU-PH, Hôpital Saint-Antoine           | Examineur          |









---

# Remerciements

---

Cela aura été une expérience (c'est le cas de le dire ...) intense, éprouvante mais surtout enrichissante. Je voudrais donc remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée durant ces années passées au LCMD.

En premier lieu je remercie Jérôme Bibette pour m'avoir accueillie au laboratoire, et pour ses conseils avisés sur mon travail de recherche ainsi que pour la préparation de ma soutenance.

Je remercie très chaleureusement Jean Baudry. J'ai véritablement apprécié son encadrement du début à la fin de cette thèse, sa disponibilité, ainsi que ses nombreuses connaissances, idées et sa vision pertinente des choses. J'espère faire bon usage dans le futur de tout ce qu'il m'a appris et transmis !

Je remercie vivement Florence Condamine, son sens de l'organisation mais surtout sa bienveillance vis-à-vis de chacun sont des atouts de taille pour le LCMD. Et puis je la remercie pour nos innombrables discussions, ce fut un très agréable bureau que j'ai eu la chance d'occuper durant ces années.

Je remercie Nicolas Bremond pour les discussions au détour d'une manip, et pour ses conseils éclairés lors de la préparation de ma soutenance de thèse.

Je tiens à remercier Fernando Leal Calderon et Annie Viallat pour avoir accepté de lire mon manuscrit, leurs retours constructifs ainsi que pour la discussion très intéressante qui a eu lieu lors de ma soutenance. Je remercie aussi Valérie Pichon, Marco Cavallari et Luc Douay pour avoir accepté de juger mon travail et l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré chez Bertin Technologies dans le cadre de cette thèse CIFRE, Marco Cavallari, Luc Lotteau, Elodie Brient Litzler, Amandine Verdier ainsi que Julien Charpentier. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux notamment lors de la conception de l'automate de tri.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer au sein du Laboratoire Prolifération et différenciation des cellules souches, dirigé par le Professeur Douay et grâce à qui j'ai pu travailler avec des cellules souches hématopoïétiques. Je remercie Laurence Harmand pour m'avoir appris à travailler avec des cellules, pour toutes les fois où elle a pris le temps de répondre à mes questions, pour les cellules qu'elle me préparait et pour nos agréables déjeuners ! Je remercie Marie-Catherine Giarratana pour notre collaboration fructueuse sur le sang artificiel.

Je remercie le Dr. Philippe Hénon de l'Institut de Recherche en Hématologie et Transplantation pour les discussions enrichissantes que nous avons eues lors des différentes réunions qui ont ponctué cette thèse.

Maintenant je souhaite remercier tous mes collègues grâce à qui j'ai passé de supers années au labo !

Tout d'abord je voudrais remercier mes collègues de bureau en commençant par Fanny ! Merci pour nos discussions sur tout et n'importe quoi, des origines de l'entropie en passant par les sacs à main, puis la politique, pour finir par les hauts et les bas qui ont rythmé nos vies. C'était vraiment super et j'espère que ça continuera même en étant plus éloigné ! Je remercie ensuite Perrine pour ces derniers mois de thèse passés ensemble ! Je me souviendrai longtemps de nos soirées soupes + Friends, de nos retours à pas d'heure, de nos courses pour voir briller la Tour Eiffel .... Je suis contente d'avoir partagé ces mois de rédaction avec toi et j'espère que notre collaboration Zumba a encore de longs jours devant elle ... Jairo, el primer chico en el estudio de las chicas ! Gracias para todas las discusiones, tu gentileza y tu sonrisa ! Deseo para ti todo lo mejor en el futuro !

Je souhaite remercier maintenant les anciens du labo (ça vous donne un coup de vieux j'espère !). Merci Donatien pour ton sens de l'humour sans faille ! Merci Denis, nos quelques cohabitations dans le bureau des filles ont toujours été très sympathiques ! Merci Niko pour ta bonne humeur et tes conseils de biologiste ! Merci Leslie, c'est toujours un plaisir de te voir et de discuter ensemble. Heureusement que tu étais là pour mettre un peu d'ordre chez les Capsuliers ! Merci Kevin d'être venu mettre ton grain de sel au LCMD, ça a toujours été très sympa ! Merci Hugo pour tous ces moments passés ensemble et ces défis relevés sous un PSM pour produire du sang (rien que ça !), mais aussi sur scène (Susan, Ivy, Veronica, Flo et Maggie te passent le bonjour, d'ailleurs Maggie a accouché d'un petit garçon...) c'était vraiment génial !

Je tiens à remercier tous ceux qui sont encore d'actualité au laboratoire. Mes comparses de rédaction Rory et Eren, merci pour ces nombreux diners et déjeuners pris ensemble. Grâce à vous j'ai appris plein de choses sur la Turquie et les oiseaux mais j'ai surtout passé de bons moments ! Merci Damien pour ta sagesse d'ancien thésard qui permet de relativiser quand on a la tête dans le guidon, pour ses longues discussions et bonne chance pour ta start-up !! Léopold #Merci! #BonneHumeur #Poseyyy. Ça a été un plaisir de cohabiter avec toi au labo ! Bon courage pour la fin de ta thèse #BientôtDrMottet ! Je remercie Mathieu, ces déjeuners au RU et ces pauses faites dans le bureau des garçons ont été très sympathiques malgré ta stupéfaction devant mon ignorance du sport ! Merci Edouard pour toutes ces bonnes adresses dans le 5eme et pour les discussions enrichissantes !

Et merci à tous les autres membres actuels et passés du LCMD : Anette, Gabrielle, Klaus, Laurent, Jamie, Noushin, Gwen, Koceila, Shima, Claire, Jean Baptiste, Lianmei, Krzysztof, Hojjat, Andrzej, Ladislav, Wang, Laurie, Celine, Bau, Emmanuelle, Vlasios, Anna, Coline, qui ont contribué à la bonne ambiance de travail au LCMD.

Je remercie Lise Michelot, Isa Borsenberger et Hélène Dodier de nous permettre de travailler efficacement au LCMD.

Pour avoir permis à ce travail de thèse d'avancer, je remercie les stagiaires qui ont travaillé avec moi Rodolphe Meyer et Marion Kieffer.

Je voudrais remercier mes amis et amies ! Merci à Martial qui m'a soutenue au début de cette thèse. Merci à tous ceux que j'ai rencontrés à l'ESPCI et avec qui j'ai passé de supers années (soirées...) Antoine, Alice, Marie F, Marie D, Zheng, Amir, Renaud, Emie, Louise, Alexis, Johanna et Marine ! Merci à mes supers colocs Alice, Louise et Jeanne toujours prêtes pour un running ! Merci à mes copines de collègue, notamment Alice d'être là et d'avoir tout compris à ma soutenance ! Merci à mes compagnons de théâtre, Charlotte, Robbie, Amaury, Hugo, Fabien, Paul, Pauline... avec qui je me suis énormément amusée !!!! Merci à Adrien pour les couchers de soleil !

Je voudrais finalement remercier ma famille qui m'accompagne depuis de longues années, mes parents bien sûre pour tout leur soutien, mes sœurs Charlotte et Suzanne pour tout ce qu'elles m'apportent. Ainsi que René et les derniers arrivés Luca et Tom ! Je remercie également mon frère Jolyot (notamment pour ses conseils pour bien dormir...) ainsi que sa petite famille. Je voudrais aussi remercier Françoise et Jean Paul pour notre agréable cohabitation (et les bons petits plats...). Merci à Lucie ! Et Merci aux « Fouché » toujours là pour faire la fête !

*« Alors si on faisait un pas de côté ? Si on essayait autre chose ? Si on faisait un pas de côté on verrait ce qu'on ne voit jamais. »*

L'An 01, Gébé et Jacques Doillon, 1972.



---

# Table des matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction générale</b>  | <b>12</b> |
| <b>1. Le tri cellulaire</b>   | <b>14</b> |
| <b>1.1. Présentation du contexte biologique et médical</b>  | <b>14</b> |
| 1.1.1. La médecine régénérative   | 14        |
| 1.1.1.1. Les cellules souches   | 14        |
| 1.1.1.2. Les thérapies cellulaires  | 15        |
| 1.1.1.3. Pourquoi est-il nécessaire de trier les cellules ?                                       | 17        |
| 1.1.2. Le diagnostic  | 19        |
| 1.1.3. Conclusion   | 19        |
| <b>1.2. Etat de l'art du tri cellulaire</b>   | <b>20</b> |
| 1.2.1. Comment identifier une fonction biologique ?   | 20        |
| 1.2.2. Les méthodes de tri basées sur des critères physiques                                      | 21        |
| 1.2.2.1. La densité des cellules  | 21        |
| 1.2.2.2. La taille, la forme et la déformabilité des cellules                                     | 22        |
| 1.2.3. Le tri par affinité  | 22        |
| 1.2.3.1. Les anticorps  | 23        |
| 1.2.3.2. Fluorescence Assisted Cell Sorting – FACS  | 23        |
| 1.2.3.3. Magnetic Assisted Cell Sorting - MACS  | 25        |
| 1.2.3.4. La chromatographie d'affinité de cellules  | 28        |
| <b>1.3. Présentation de la méthode de tri cellulaire étudiée</b>                                  | <b>31</b> |
| 1.3.1. Principe de la technique de tri  | 31        |
| 1.3.2. Description de l'interaction spécifique ligand-récepteur                                   | 34        |
| 1.3.2.1. Interaction spécifique entre deux molécules en solution                                  | 34        |
| 1.3.2.2. Interaction spécifique entre deux molécules attachées à des surfaces                     | 36        |
| 1.3.2.3. Etape de rencontre en chromatographie d'affinité cellulaire                              | 37        |
| <b>1.4. Conclusion</b>  | <b>39</b> |
| <b>1.5. Bibliographie</b>   | <b>40</b> |
| <b>2. Etude de l'étape de transport permettant aux cellules d'atteindre la surface des billes</b> | <b>46</b> |
| <b>2.1. Etude expérimentale de l'étape de transport</b>   | <b>46</b> |
| 2.1.1. Système modèle   | 46        |
| 2.1.1.1. Interaction entre les billes d'alginate et les particules                                | 46        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 2.1.1.2.    | Les billes d'alginate   | 47         |
| 2.1.1.3.    | Les particules magnétiques  | 50         |
| 2.1.2.      | Présentation du dispositif expérimental   | 51         |
| 2.1.3.      | Quantification de la capture  | 55         |
| 2.1.4.      | Résultats   | 60         |
| 2.1.4.1.    | Mesure de la capture en fonction du temps et détermination de la constante cinétique d'association $k_{on}$ | 60         |
| 2.1.4.2.    | Cinétique d'association en fonction de la vitesse   | 66         |
| 2.1.4.3.    | Cinétique d'association en fonction de la taille des billes   | 68         |
| 2.1.4.4.    | Saturation de la surface des billes   | 69         |
| 2.1.5.      | Conclusion  | 72         |
| <b>2.2.</b> | <b>Interprétation des résultats</b>   | <b>73</b>  |
| 2.2.1.      | Les phénomènes physiques à l'origine du transport des particules à proximité des billes                     | 73         |
| 2.2.1.1.    | Présentation du modèle simplifié de Yao   | 74         |
| 2.2.1.2.    | Les interactions entre les surfaces   | 80         |
| 2.2.2.      | Interprétation des données expérimentales   | 82         |
| 2.2.3.      | Conclusion  | 85         |
| <b>2.3.</b> | <b>Conclusion</b>   | <b>86</b>  |
| <b>2.4.</b> | <b>Bibliographie</b>  | <b>87</b>  |
| <b>3.</b>   | <b>La capture spécifique</b>  | <b>89</b>  |
| <b>3.1.</b> | <b>La fonctionnalisation des billes</b>   | <b>89</b>  |
| 3.1.1.      | Introduction  | 89         |
| 3.1.2.      | Fonctionnalisation des billes d'alginate  | 91         |
| 3.1.2.1.    | Le greffage de la streptavidine   | 91         |
| 3.1.2.2.    | La réactivité de la streptavidine greffée   | 92         |
| 3.1.3.      | Augmentation de la densité surfacique de fonctionnalisation   | 97         |
| 3.1.3.1.    | Le greffage de biotine sur des billes d'alginate  | 97         |
| 3.1.3.2.    | Le greffage de la streptavidine sur les billes de verre   | 99         |
| 3.1.4.      | Conclusion  | 101        |
| <b>3.2.</b> | <b>La capture spécifique</b>  | <b>101</b> |
| 3.2.1.      | Le système étudié   | 101        |
| 3.2.2.      | Montage expérimental et quantification de la cinétique de capture   | 103        |
| 3.2.3.      | Résultats et interprétation   | 106        |
| 3.2.3.1.    | Le système modèle   | 106        |
| 3.2.3.2.    | La capture grâce aux anticorps  | 111        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 3.2.4.      | Conclusion -----   | 114        |
| <b>3.3.</b> | <b>La chromatographie cellulaire pour une application médicale à grande échelle -----</b>    | <b>115</b> |
| 3.3.1.      | La section de la colonne -----   | 117        |
| 3.3.2.      | La concentration cellulaire -----  | 118        |
| 3.3.3.      | Le rayon des billes -----  | 118        |
| 3.3.4.      | La vitesse d'écoulement et la longueur de la colonne -----                                   | 119        |
| 3.3.4.1.    | Le tri de cellules souches après une phase d'amplification pour la thérapie cellulaire ----- | 119        |
| 3.3.4.2.    | Quels sont les avantages de la présence d'un écoulement ? -----                              | 122        |
| 3.3.5.      | Conclusion -----   | 123        |
| <b>3.4.</b> | <b>Conclusion -----</b>  | <b>124</b> |
| <b>3.5.</b> | <b>Bibliographie -----</b>   | <b>125</b> |
| <b>4.</b>   | <b>Automate de tri cellulaire -----</b>  | <b>127</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Introduction -----</b>  | <b>127</b> |
| <b>4.2.</b> | <b>Description de l'automate de tri cellulaire développé par Bertin Technologies -----</b>   | <b>128</b> |
| 4.2.1.      | La définition du cahier des charges -----  | 128        |
| 4.2.2.      | La zone de séparation contenant les billes pour la capture de cellules -----                 | 129        |
| 4.2.3.      | L'automate dans son intégralité – stockage et distribution des différentes solutions -----   | 131        |
| 4.2.4.      | Séquence des étapes permettant de trier les cellules -----                                   | 134        |
| <b>4.3.</b> | <b>Conformité de l'automate et retour d'expérience -----</b>                                 | <b>135</b> |
| 4.3.1.      | Limitation de la perte des cellules dans les volumes morts -----                             | 136        |
| 4.3.2.      | Montage des seringues, pousse-seringues et zone de séparation -----                          | 138        |
| <b>4.4.</b> | <b>Conclusion -----</b>  | <b>139</b> |
| <b>4.5.</b> | <b>Bibliographie -----</b>   | <b>139</b> |
|             | <b>Conclusion générale -----</b>   | <b>140</b> |
|             | <b>Annexes -----</b>   | <b>142</b> |
|             | <b>Protocoles -----</b>  | <b>148</b> |

---

# Introduction générale

---

Les avancées en biologie et en particulier celles concernant la génétique et les cellules souches permettent le développement des biotechnologies dans notre société. Dans le domaine médical la recherche porte sur la mise au point de biothérapies qui reposent sur le vivant, en parallèle des chimiothérapies qui utilisent des substances de synthèse chimique. De nombreux espoirs sont portés par ces nouvelles thérapies qui pourraient permettre de traiter un grand nombre de pathologies comme la maladie d'Alzheimer, l'infarctus du myocarde, ou bien certain cancers. Cependant les challenges scientifiques et technologiques à relever sont encore nombreux. Le tri cellulaire, c'est-à-dire l'isolation d'une sous population de cellules à partir d'un mélange hétérogène, est un des défis à appréhender.

Le tri cellulaire repose généralement sur une interaction spécifique entre un ligand et un récepteur. Cette interaction est très largement étudiée dans le monde scientifique car elle régit des phénomènes biologiques importants tels que la communication entre cellules, ou bien la migration cellulaire. Le Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés, où j'ai réalisé ma thèse, a étudié cette interaction spécifique d'un point de vue physico-chimique. C'est dans ce contexte que j'ai réalisé une thèse portant sur une nouvelle méthode de tri cellulaire : la chromatographie d'affinité. Mon travail a été mené dans le cadre d'une thèse CIFRE avec l'entreprise Bertin Technologies. Nous avons donc porté une attention particulière aux implications de notre étude pour le développement d'une technique de tri cellulaire à échelle industrielle.

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres. Le premier chapitre aborde le tri cellulaire et ses applications dans le monde médical. Notre démarche s'inscrit dans le développement d'une technologie pour une utilisation clinique nous nous attachons donc aux besoins et aux exigences des applications finales. Le second chapitre présente l'étude expérimentale de la cinétique de transport des cellules dans une colonne chromatographique. Cette étude a nécessité la mise en place d'un dispositif expérimental, que nous décrivons dans un premier temps puis nous discutons les résultats obtenus. Dans le troisième chapitre, nous abordons l'étude expérimentale de la cinétique d'association spécifique. Les résultats obtenus nous permettent finalement de réfléchir au dimensionnement de la colonne chromatographique et

au protocole de tri à mettre en place. Le dernier chapitre porte sur le développement d'un automate de tri cellulaire basé sur le principe de la chromatographie.

---

# 1. Le tri cellulaire

---

Dans ce chapitre je vais présenter le contexte biologique et médical du tri cellulaire, puis nous verrons quelles sont les solutions existantes aujourd'hui. Dans un dernier temps j'exposerai la méthode de tri sur laquelle nous avons travaillé, ainsi que la démarche adoptée pendant cette thèse.

## 1.1. Présentation du contexte biologique et médical

### 1.1.1. La médecine régénérative

#### 1.1.1.1. Les cellules souches

Un des grands espoirs pour la médecine de demain est le développement des biothérapies. Contrairement aux médicaments classiques issus de la chimie de synthèse, ces thérapies copient les molécules synthétisées par les organismes vivants (comme les anticorps), ou bien utilisent les organismes eux-mêmes. Parmi ces biothérapies, deux voies se démarquent : les thérapies géniques et les thérapies cellulaires car elles ont comme objectif de guérir définitivement les patients en modifiant à long terme le corps humain. La thérapie cellulaire est basée sur l'utilisation de cellules thérapeutiques pour restaurer la fonction défectueuse d'un tissu ou d'un organe. C'est en particulier une voie prometteuse pour le traitement des maladies dégénératives (caractérisées par la destruction d'une population cellulaire) comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, les lésions de la moelle épinière, le diabète de type 1, la dégénérescence de la rétine (DMLA)... qui ne disposent pas aujourd'hui de traitements efficaces. La régénération de tissus ou d'organes à partir de cellules thérapeutiques est appelée médecine régénérative. Les cellules qui permettent de réaliser une telle prouesse, sont les cellules souches embryonnaires, CSE, qui possèdent deux caractéristiques essentielles :

- l'auto renouvellement : une cellule souche peut se diviser en deux cellules filles, dont une au minimum reste souche. Elles ont donc une capacité de renouvellement illimitée.
- la pluripotence : ce sont des cellules indifférenciées qui sont capables de se différencier en n'importe quelles cellules différenciées de l'organisme.

Ces deux caractéristiques permettent d'envisager la production à grande échelle de cellules « médicaments ». Grâce à l'auto renouvellement nous disposons de la matière première. Et la pluripotence permet de produire une grande variété de cellules et donc de traiter un large spectre de maladies. Cependant leur utilisation pose des problèmes éthiques.

Il existe d'autres sources de cellules souches comme les cellules souches adultes, CSA, qui ont des applications plus restreintes mais posent moins de problèmes éthiques. En effet leur capacité de renouvellement est moins grande que celle des CSE (le nombre de division est grand mais pas illimité) et ce ne sont pas des cellules pluripotentes mais multipotente. Cela signifie qu'elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation, elles peuvent donc se différencier en un certain type de cellules de l'organisme. C'est le cas par exemple des cellules souches hématopoïétiques, CSH. Ces cellules souches adultes peuvent se différencier en globules rouges, globules blancs et plaquettes, c'est-à-dire en toutes les cellules sanguines. Les CSA sont récupérées sur un organisme adulte sans remettre en cause sa viabilité. Les CSH sont par exemple récupérées à partir d'un prélèvement sanguin classique, ou dans le sang de cordon ombilical qui est un déchet après l'accouchement.

Les iPS, induced Pluripotent Stem Cells. sont des cellules souches pluripotentes produites à partir de cellules adultes différenciées<sup>1</sup>. C'est une autre alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires, cependant pour le moment leur production pose des questions de sécurité pour une utilisation thérapeutique.

Le potentiel des thérapies cellulaires est gigantesque, car en partant de cellules souches pluripotentes toutes les fonctions d'un organisme peuvent théoriquement être restaurées. Mais il y a encore de nombreux challenges scientifiques, technologiques et éthiques avant que cette solution thérapeutique entre dans l'arsenal quotidien des médecins<sup>2</sup>.

### 1.1.1.2. Les thérapies cellulaires

Le principe d'une thérapie cellulaire est que les cellules médicaments sont greffées chez le patient. Elles peuvent être directement mises au niveau de l'organe défectueux<sup>3</sup>, ou bien être injectées dans la circulation sanguine, et se greffer elles-mêmes sur l'organe cible.

Actuellement les thérapies cellulaires les mieux maîtrisées et effectuées fréquemment concernent les cellules sanguines. Cela est probablement dû à la structure liquide (contrairement à l'organisation 3D complexe des autres organes) et à la facilité d'accès et de prélèvement de cet organe. Les cellules médicaments sont les cellules souches hématopoïétiques, CSH. Ce traitement est utilisé en cas de leucémie (cancer affectant les CSH). Elles peuvent être prélevées sur le patient lui-même, dans ce cas c'est une greffe autologue, ou bien provenir d'un donneur compatible, dans ce cas c'est une greffe allogénique. Les CSH sont récupérées par un prélèvement sanguin ou bien de moelle osseuse qui contient en majorité des globules rouges, des plaquettes et des globules blancs. Au cours du traitement, les CSH sont injectées dans la circulation sanguine du patient, afin de coloniser la moelle osseuse (lieu de production des cellules sanguine par les CSH).

Il y a environ  $5.10^4$  greffes de CSH par an dans le monde. Les thérapies cellulaires sont donc des traitements encore peu répandus. Mais de nombreux essais cliniques sont en cours dans le but de développer la médecine régénérative. C'est le cas par exemple d'une start up française CellProthera, créée en 2008 par le Pr. Hénon, qui propose de traiter l'infarctus du myocarde par une injection de CSH. Après un infarctus, les CSH du patient sont récupérées. Ces cellules sont amplifiées puis réinjectées dans la circulation sanguine.

L'objectif à long terme de la médecine régénérative serait d'avoir à disposition des stocks de cellules d'intérêts thérapeutiques. Dès qu'un patient aurait besoin d'une greffe, ces banques de cellules seraient sollicitées. Le processus compliqué et limitant du don d'organe ou de recherche de donneur n'aurait plus lieu d'être. La Figure 1-1, ci-dessous, inspirée de l'article de Abbasalizadeh S.<sup>2</sup>, présente le processus simplifié de production de ces cellules thérapeutiques.

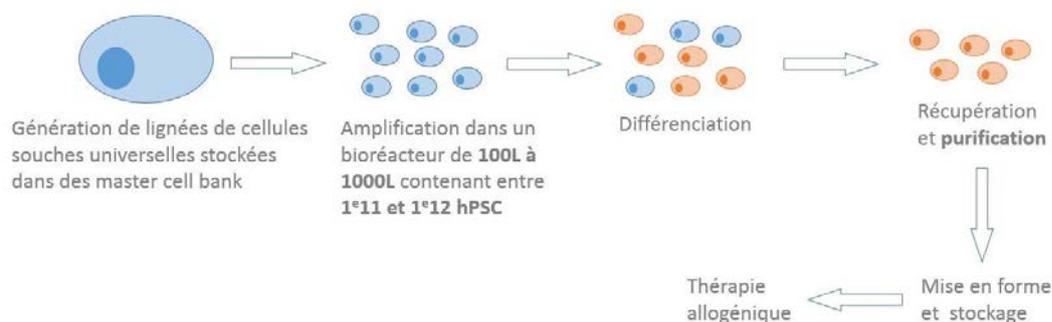


Figure 1-1 : Processus simplifié de production de cellules souches humaines pluripotentes à grande échelle dans le cadre de thérapie allogénique.

La première étape est la génération de lignées cellulaires universelles de cellules souches pluripotentes, stables et de grade clinique. Le terme « universelle » signifie qu'elles sont compatibles avec tous les systèmes HLA (Human Leucocyte Antigen). Ces lignées seraient produites à partir de cellules souches embryonnaires, ou d'iPS. Elles seraient ensuite stockées dans des banques cellulaires, qui permettraient de lancer une ligne de production. La première étape de production serait l'amplification des cellules souches pour obtenir entre 100 et 1000 milliards de cellules. Ces cellules seraient ensuite différenciées dans le type cellulaire désiré.

L'approvisionnement de la matière première, en l'occurrence les cellules souches pluripotentes, est une question importante lorsqu'une production à grande échelle est lancée. Des équipes ont travaillé sur la génération d'iPS sans recourir à la reprogrammation génétique, mais grâce à l'action de quelques molécules<sup>4</sup>. Cela rend leur production plus adaptée à une utilisation clinique du point de vue de la simplicité de production et de la sécurité<sup>5</sup>. D'autres recherches sont menées sur les cellules souches embryonnaires pour dépasser les problèmes éthiques. Des études sont aussi en cours pour surmonter

la barrière immunologique et les problèmes de compatibilité<sup>2</sup>. Tout cela ouvre la voie à un approvisionnement à grande échelle en cellules souches. En parallèle, des recherches sont menées sur le stockage des cellules par cryopréservation<sup>6,7</sup>, des protocoles de mise en culture, d'amplification et de différenciation dans des conditions de production cGMP<sup>2</sup> (current Good Manufacturing Production), et sur leur mise en forme en tant que « médicament ».

La recherche scientifique sur les cellules souches essaye de relever petit à petit les challenges scientifiques et techniques, dont le tri cellulaire, pour le développement d'une médecine régénérative à grande échelle.

### 1.1.1.3. Pourquoi est-il nécessaire de trier les cellules ?

Le principe du tri cellulaire est d'isoler un type cellulaire à partir d'une suspension cellulaire hétérogène, comme cela est représenté sur la Figure 1-2 dans le cas des CSH.

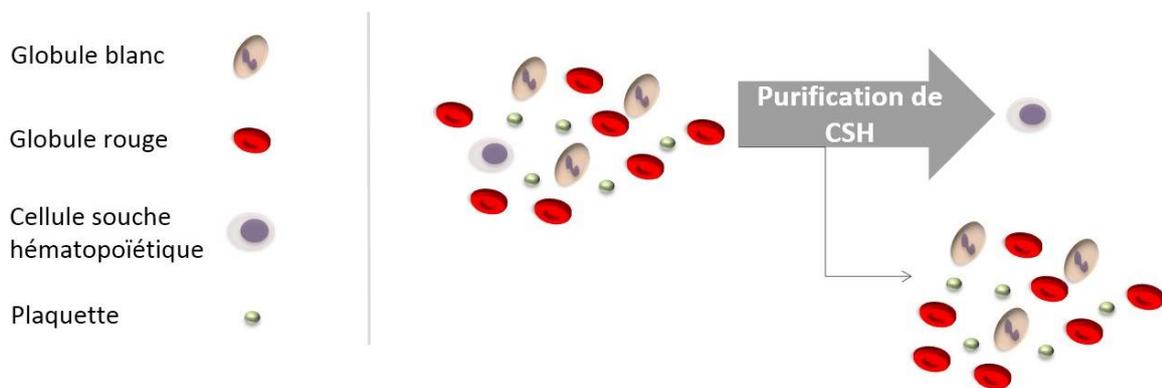


Figure 1-2 : Principe du tri cellulaire dans le cas de la purification des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le prélèvement sanguin initial contient des globules rouges, des globules blancs, des plaquettes et des CSH qui représentent 0,001% des cellules totales. Le tri cellulaire permet d'isoler un type cellulaire d'intérêt, en l'occurrence les CSH.

Nous allons voir, en quoi le tri cellulaire est une étape indispensable dans le milieu médicale, et en particulier dans le cadre des thérapies cellulaire.

### Le tri de cellules souches hématopoïétiques

Une des complications importantes à la suite d'une transplantation allogénique de CSH est l'apparition d'une réaction immunitaire du greffon contre l'hôte (Graft Versus Host Disease - GVHD). Dans ce cas les lymphocytes T du donneur présents dans le greffon attaquent les cellules du patient ayant reçu la greffe. C'est une cause importante de mortalité. Un moyen de lutter contre les GVHD est d'éliminer les lymphocytes T du greffon. Pour ça deux voies sont possibles : enlever spécifiquement les lymphocytes T, ou récupérer spécifiquement les CSH<sup>8,9</sup>. Cependant le nombre de CSH greffées est un paramètre déterminant pour la réussite de la greffe, et certaines études suggèrent que cette phase de

tri induit la perte d'un nombre important de CSH entraînant l'échec de la greffe<sup>8,10</sup>. En outre la mise au point d'une technique de tri cellulaire efficace, réduisant la réaction immunitaire du greffon, permettrait d'augmenter les chances de trouver un donneur en réduisant les contraintes de compatibilité entre le donneur et le receveur<sup>11</sup>.

Le tri cellulaire est donc un processus essentiel pour l'amélioration du traitement des leucémies en réduisant les complications (pouvant être mortelles) après une transplantation, et en augmentant les chances de trouver un donneur. Le site gouvernemental américain [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) dénombre 31 études cliniques dans ce domaine. Cette application médicale nécessite une méthode de tri avec un rendement et une pureté importants pour obtenir un greffon avec le maximum de CSH et le minimum de lymphocyte T. Pour un adulte il est nécessaire de récupérer de l'ordre de  $1.10^8$  à  $5.10^8$  CSH ce qui implique un rendement minimal de 65%. De plus ce sont des cellules rares, leur concentration sanguine est de  $3.10^4$  CSH.mL<sup>-1</sup>, alors que la concentration en globules rouges est de  $5.10^9$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Les volumes des prélèvements sont de l'ordre de quelques centaines de millilitres, ce qui reste encore à l'échelle d'un laboratoire. Une contrainte importante est que le tri ne doit pas altérer l'état physiologique des cellules, elles doivent rester viables et fonctionnelles. L'ensemble du processus doit répondre à des exigences de stérilité, toxicité, biocompatibilité... Enfin le coût et la durée de la séparation ne doivent pas être prohibitifs.

### La thérapie cellulaire à grande échelle

Lors de la production de cellules thérapeutiques, à l'issue de la phase de différenciation (cf. Figure 1-1), la suspension cellulaire contient des cellules différenciées mais aussi des cellules indifférenciées. Le risque lié à la greffe de cellules indifférenciées est la formation de tératomes<sup>2,3</sup>, qui est une formation tumorale pouvant être maligne. Il est donc indispensable de purifier la suspension cellulaire issue de la phase de différenciation.

Dans ce cas les volumes et les quantités de cellules d'intérêts en jeu sont 10 000 fois plus importants que pour les applications actuelles. Cela nécessite donc une méthode de séparation à grande échelle, c'est-à-dire pouvant traiter quelques centaines de litres de suspension cellulaire en un temps raisonnable, et pouvant récupérer des milliers de milliards de cellules. La pureté et le rendement du tri sont très importants pour s'assurer d'éliminer toutes les cellules potentiellement tumorigènes. Un autre aspect à prendre en compte est la simplicité d'utilisation. C'est un paramètre primordial dans le milieu industriel, car cela peut avoir un impact sur le coût final du produit. Plus la méthode est compliquée, plus la durée est importante, plus le personnel doit être qualifié, plus le risque d'erreur est grand.... A titre de comparaison il ne faut pas prendre le coût de production d'un médicament classique car dans le cas de la thérapie cellulaire grâce à une injection de cellule le malade est

définitivement guéri. D'après l'INSERM, aujourd'hui le coût de production de cellules thérapeutiques pour un patient est autour de 15 000 euros. En cas d'infarctus du myocarde un traitement classique est la prise d'un comprimé de plavix par jour, ce qui revient à 300 euros par an, ou 3000 euros sur 10 ans, sans que le patient soit guéri. Le coût actuel des thérapies cellulaires n'est donc pas prohibitif et il devrait encore baisser avec le développement de la médecine régénérative à grande échelle.

Nous venons de voir que la purification cellulaire est un point clé lors d'une thérapie cellulaire. Le tri spécifique de cellules est nécessaire dans un autre domaine de la santé, le diagnostic comme je vais le présenter.

### 1.1.2. Le diagnostic

Dans certains cas le diagnostic médical repose sur l'isolation spécifique d'un type cellulaire. Par exemple pour le cancer, la détection des cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang est un indicateur de l'efficacité d'un traitement anticancéreux<sup>12</sup>. La difficulté dans ce cas, est la grande rareté des CTC : typiquement 5 CTC dans 7,5mL de sang<sup>13</sup> (le volume d'une prise de sang). Ce sont des cellules rares, de plus les médecins souhaitent les détecter le plus tôt possible dans le développement de la maladie. Les contraintes sur le rendement sont importantes car s'il est trop faible on risque des faux négatifs. A l'issue de la séparation, les cellules doivent être détectées et caractérisées mais elles ne sont pas injectées chez l'humain. Les exigences de cGMP, toxicité, biocompatibilité ... sont donc moins contraignantes que dans le cadre des thérapies cellulaires.

### 1.1.3. Conclusion

Le tri cellulaire est un domaine qui tend à devenir de plus en plus important dans le milieu médical avec le développement de la médecine régénérative. Selon les applications, les besoins sont divers en termes de volume, de nombre de cellules, de performances, de coût, de simplicité d'utilisation .... Ce domaine n'est pas cantonné au milieu médical, il trouve aussi des applications dans la détection d'agents pathogènes sur des chaînes de production (alimentaire par exemple), ou bien dans le milieu militaire. Dans ce dernier exemple, les contraintes sur la portabilité et la simplicité de la technique de tri sont fortes.

Je vais maintenant vous présenter les méthodes de tri cellulaire actuellement disponibles, et la technique sur laquelle nous avons travaillé.

## 1.2. Etat de l'art du tri cellulaire

### 1.2.1. Comment identifier une fonction biologique ?

Dans les exemples cités ci-dessus, les cellules à isoler sont les CSH, les lymphocytes T, les cellules indifférenciées ou bien les CTC. Les cellules souches hématopoïétiques sont définies comme les cellules à l'origine de l'hématopoïèse, c'est-à-dire le renouvellement continu des cellules sanguines. Les cellules à l'origine des tératomes, sont des cellules pluripotentes (pouvant se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme). Les CTC sont des cellules tumorales en circulation dans le sang. On cherche à isoler des cellules sur une caractéristique biologique. Une question centrale est donc : comment est-ce que cette caractéristique biologique se traduit en caractéristique physique détectable ? Ces caractéristiques biologiques sont principalement dues à une expression génétique différentielle entre les types cellulaires. Cependant il n'est pas possible de sonder l'expression génétique des cellules, en les gardant intactes. Pour cela il est nécessaire de lyser les cellules afin d'analyser leur contenu en ARN (acide ribonucléique) ou en protéines sauf pour certaines protéines membranaires. En effet certaines protéines insérées dans la membrane plasmique, sont accessibles à l'extérieur de la cellule. Le tri de cellule repose donc principalement sur la reconnaissance de protéine membranaire spécifique d'un type cellulaire. Certains sucres présents sur la membrane des cellules peuvent aussi être un indicateur d'une caractéristique biologique. Ces protéines et sucres sont des marqueurs de surface. Ce tri est appelé tri par affinité.

Par exemple pour isoler des CSH, les cellules sont triées sur la présence de la protéine CD34 dans leur membrane<sup>14</sup>. Ce critère permet de récupérer des CSH, mais certaines CSH n'expriment pas la protéine CD34, et d'autres types cellulaires expriment cette protéine. La question du marqueur permettant de sélectionner des CSH n'est donc pas close. Des équipes continuent d'étudier la présence de certaines protéines et la capacité de renouvellement des cellules sanguines<sup>15</sup>. Cette fonction est testée en regardant si les cellules sélectionnées sont capables de reconstituer le système immunitaire de souris immunodéficientes.

Le critère permettant de purifier les suspensions cellulaires des cellules indifférenciées à l'origine des tératomes n'est pas encore totalement défini. Certains chercheurs se basent sur une modification de la glycosylation des protéines membranaires lorsque les cellules s'engagent dans une voie de différenciation<sup>3</sup>.

Concernant les CTC nous ne connaissons pas aujourd'hui de marqueur totalement satisfaisant, ce qui limite le développement d'outil de diagnostic performant<sup>12</sup>.

Les cellules diffèrent aussi entre elles sur des caractéristiques physiques comme la taille, la densité, la déformabilité... Ces critères permettent de distinguer les grandes familles de cellules comme par exemple les globules blancs et rouges, mais elles ne distinguent pas les cellules sur une caractéristique biologique précise.

Je vais maintenant présenter les techniques de tri les plus répandues, en particulier pour les applications thérapeutiques.

## 1.2.2. Les méthodes de tri basées sur des critères physiques

### 1.2.2.1. La densité des cellules

Les séparations sur un critère de densité ont une faible sélectivité mais c'est un moyen simple d'enrichir l'échantillon en cellules d'intérêt. Considérons le cas d'un échantillon de sang à partir duquel on veut isoler les CSH. Le sang est un milieu complexe composé en volume de 50% de cellules et 50% de liquide contenant de nombreuses protéines pouvant coaguler. Les CSH représentent 0,001% de toutes les cellules, qui sont composées à 95% de globules rouges. En amont du tri par affinité en recherche comme en clinique, les échantillons sanguins subissent donc une série de centrifugations qui permet d'éliminer les globules rouges, les granulocytes et les plaquettes. Une étape particulièrement importante est la centrifugation sur gradient discontinu de densité. C'est une des plus anciennes méthodes de séparation cellulaire datant de 1968<sup>16</sup>. On utilise un milieu de densité 1,077 (Ficoll-Isopaque ou Percoll) disposé au fond d'un tube. Les cellules contenues dans un tampon de densité 1 sont déposées sur ce milieu<sup>17</sup>. Durant la centrifugation les globules rouges et les granulocytes sédimentent au fond du tube, tandis que les cellules mononucléées et les CSH se trouvent à l'interface entre les deux milieux. Les cellules mononucléées et les CSH peuvent être récupérées seules. En éliminant les globules rouges et les granulocytes, les CSH sont enrichies d'un facteur 2000 dans la suspension. Cela permet ensuite de réaliser un tri par affinité avec de meilleures performances en évitant en particulier la formation d'agrégats cellulaire.

Cette technique de séparation peut aussi être utilisée seule pour des applications cliniques, c'est ce qu'on appelle l'aphérèse. Elle permet de récupérer certaines cellules en vue de leur utilisation (plaquettes, cellules mononucléées contenant les CSH) ou bien d'éliminer des cellules malades de la circulation sanguine d'un patient. Un des automates couramment utilisé pour des applications thérapeutiques est COBE® Spectra Apheresis System.

### 1.2.2.2. La taille, la forme et la déformabilité des cellules

Les cellules peuvent être triées sur un critère de taille et de déformabilité, simplement grâce à des filtres<sup>18</sup>. Le problème de ces méthodes est leur faible pertinence vis-à-vis d'une fonction biologique. Dans certains cas c'est une étape de pré-sélection comme pour la détection de CTC avec le système ISET vendue par la société Rarecells<sup>19</sup>. A la suite du tri les cellules récupérées sont analysées par des techniques de cytopathologie, de marquage immunologique.... pour déterminer leur caractère cancéreux ou non<sup>12</sup>.

La taille, la forme, la déformabilité des cellules peuvent aussi être sondées dans des puces microfluidiques grâce à des effets hydrodynamiques nécessitant de contrôler précisément l'écoulement<sup>20</sup>.

Le Gravitational field-flow fractionation<sup>21</sup> est une méthode qui permet de trier les cellules sur des critères de taille, forme et densité. Les cellules sont placées dans un écoulement de poiseuille dans un canal horizontal. Selon leur vitesse de sédimentation elles se trouvent à une certaine hauteur du canal ce qui fixe leur vitesse d'écoulement. Les cellules sortent donc du canal à un temps dépendant de leur vitesse de sédimentation.

L'application d'un champ électrique permet de trier les cellules en fonction de leurs propriétés électriques. Si le champ est uniforme c'est une séparation électrophorétique (EP), sinon c'est une séparation diélectrophorétique (DEP)<sup>22</sup>. La DEP sélectionne les cellules en fonction de leurs propriétés diélectriques qui reposent sur les caractéristiques de la membrane, la taille, la structure des cellules...

Ces méthodes de séparation sur des critères physiques ont l'avantage de ne pas intervenir directement sur les cellules et de les laisser intactes à l'issue du tri. Mais les différences physiques entre les cellules sont généralement peu pertinentes vis-à-vis de la caractéristique biologique recherchée. Ces critères de tri sont donc utilisés comme une première étape d'enrichissement avant le tri sur affinité.

### 1.2.3. Le tri par affinité

Le domaine du tri cellulaire par affinité est dominé par deux techniques : le FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting) et le MACS (Magnetic Assisted Cell Sorting). Pour des applications thérapeutiques la seule méthode autorisée en Europe et aux Etats-Unis est la séparation immuno-magnétique vendue par Miltenyi : cliniMACS.

### 1.2.3.1. Les anticorps

Le tri par affinité repose sur la reconnaissance spécifique d'une protéine ou d'un sucre à la surface des cellules grâce aux anticorps. Leur forme la plus abondante, les immunoglobulines G (IgG), est représentée en Figure 1-3.

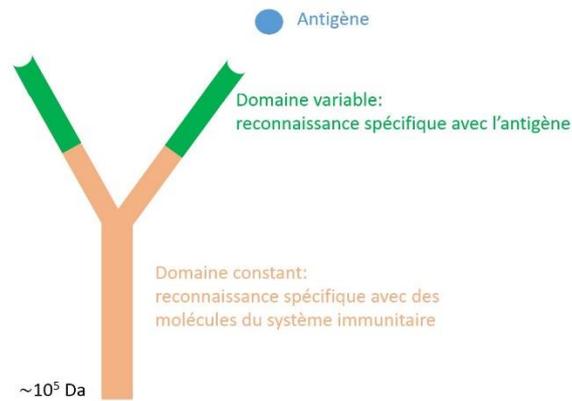


Figure 1-3 : Représentation schématique simplifiée de la structure d'un anticorps de la famille des immunoglobulines G. Cette protéine est constituée d'un domaine constant qui interagit avec les molécules du système immunitaire, et 2 sites de reconnaissance spécifique d'un antigène. La masse molaire d'un anticorps est de l'ordre de 10<sup>5</sup> Da.

Ces protéines font partie du système immunitaire et permettent de marquer les corps étrangers (et donc potentiellement pathogènes) au sein d'un organisme. Cela est assuré par les domaines variables qui reconnaissent spécifiquement les antigènes, c'est-à-dire des macromolécules caractéristiques d'un corps étranger. En interagissant avec les domaines constants de l'anticorps, d'autres acteurs du système immunitaire détruisent le corps étranger. Les anticorps sont donc des protéines capables de reconnaître spécifiquement une grande variabilité de macromolécules. La recherche sur ces molécules permet aujourd'hui de produire à échelle commerciale des anticorps reconnaissant la molécule souhaitée, comme par exemple la protéine CD34. Les techniques de tri se basant sur la reconnaissance spécifique de macromolécules à la surface des cellules sont des techniques dites par affinité car elles se basent sur l'affinité entre un anticorps et un antigène.

### 1.2.3.2. Fluorescence Assisted Cell Sorting – FACS

Le tri cellulaire par FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting) est une technique de tri par affinité développée en 1972<sup>23</sup>, qui utilise des anticorps fluorescents. La suspension cellulaire est incubée avec une solution contenant un ou plusieurs anticorps fluorescents. Ensuite les anticorps non fixés à des cellules sont éliminés, puis les cellules sont triées en fonction de leur marquage par fluorescence. Ce tri est réalisé grâce à un cytomètre, une machine qui fait passer les cellules une à une devant le faisceau d'un ou plusieurs lasers. A chaque passage l'appareil mesure le signal de fluorescence émis, ainsi que

l'intensité lumineuse diffusée dans l'axe et à 90° du rayon incident comme cela est représenté en Figure 1-4.

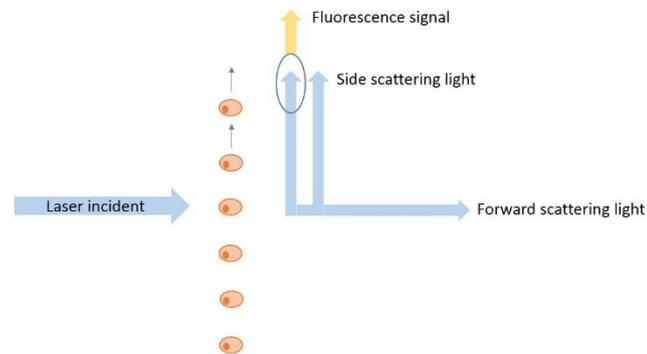


Figure 1-4 : Représentation schématique simplifiée du principe de fonctionnement d'un cytomètre. Les cellules passent une par une devant le rayon d'un laser. La lumière diffusée dans l'axe du rayon incident (forward scattering light), à 90° du rayon incident (side scattering light) et le signal de fluorescence sont détectés pour chaque cellule. La lumière diffusée dépend de la taille et de la granulosité des cellules. Le signal de fluorescence est lié à la présence d'anticorps fluorescents à la surface des cellules.

L'intensité diffusée donne des informations sur la taille et la structure interne des cellules. Cela permet de trier les cellules en grandes familles. Par exemple dans le sang les signaux d'intensité diffusée permettent de différencier les polynucléaires, les macrophages, les lymphocytes et les plaquettes, comme cela est représenté en Figure 1-5.

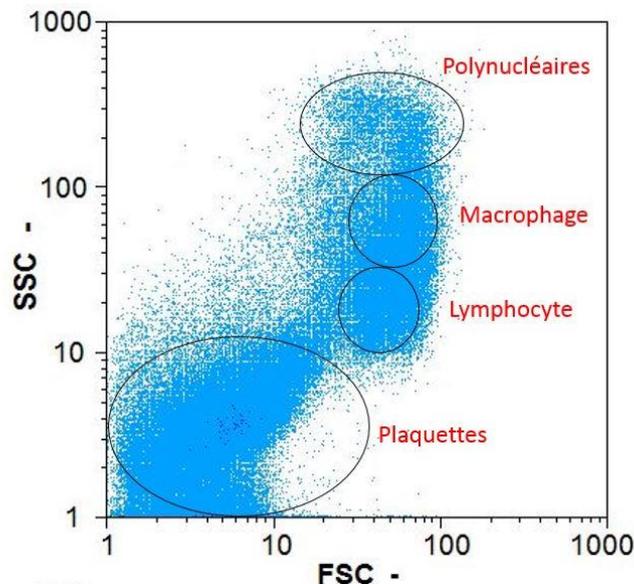


Figure 1-5 : Spectre de cytométrie, représentant les signaux d'intensité diffusée dans l'axe du rayon incident (FSC) et à 90° du rayon incident (SSC). L'échantillon est issu d'un prélèvement sanguin auquel les globules rouges ont été enlevés. Sur le spectre nous pouvons distinguer le signal dû aux plaquettes, aux lymphocytes, aux macrophages ainsi qu'au polynucléaires.

L'intensité de fluorescence donne quant à elle une information sur la présence ou l'absence du marqueur de surface. Certains cytomètres sont ensuite capables de séparer les cellules selon leur signal de fluorescence. Dans ce cas après l'analyse du signal de fluorescence le flux de cellules est fractionné en gouttes contenant idéalement une cellule. Ensuite les gouttes sont chargées différemment selon leur signal de fluorescence. Finalement le tri se fait par déviation électrostatique des gouttes qui sont envoyées dans des contenants différents. Le FACS nécessite un système fluide, optique et électronique précis. C'est donc une technique de tri compliquée, avec un appareil cher (entre 250 000 et 10 millions de dollars<sup>22</sup>), et qui nécessite des personnes qualifiées pour son utilisation. La contrepartie est que le tri est lui aussi très précis : chaque cellule est analysée une par une. La pureté est de l'ordre de 98%. Mais cela est au détriment du rendement, qui peut être de l'ordre de 40%. La fragilité de cette technique est que les cellules et/ou les gouttes doivent être assez éloignées pour être sûres d'être analysées et séparées une par une. Cependant plus les cellules et les gouttes sont séparées spatialement plus la fréquence de tri est basse. Il faut trouver un compromis correspondant à l'application.

Les avantages du FACS sont nombreux : il permet de trier et d'analyser les cellules dans le même temps, la pureté peut être très importante et on peut trier sur plusieurs critères (certains cytomètres sont capables de séparer plus de 5 populations différentes). C'est une technique performante qui a fait ses preuves dans les laboratoires de recherche. C'est la méthode de référence utilisée par les biologistes pour analyser les populations présentes dans leurs échantillons. Et c'est grâce à cette technique que les marqueurs de surface sont identifiés pour une population cellulaire.

Cependant dans le cadre d'une application clinique à grande échelle le FACS n'est pas adapté. La fréquence de tri est au maximum de l'ordre de 70 000 événements/sec. La durée de tri de  $1 \cdot 10^{12}$  cellules (nombre de cellules à trier pour les banques de cellules thérapeutiques) est  $1 \cdot 10^8$  secondes soit plus de 5 mois !

### 1.2.3.3. Magnetic Assisted Cell Sorting - MACS

Le tri cellulaire immuno-magnétique, développé à partir des années 1977<sup>24</sup>, repose sur l'utilisation de particules magnétiques nano ou micrométriques fonctionnalisées avec des anticorps. Il existe plusieurs versions du tri immunomagnétique<sup>25,26,27</sup> dont certaines sont commerciales (Ikotech, EasySep de STEMCELL Technologies, CellCap Technologies). Les deux seules méthodes de tri cellulaire autorisées par la FDA dans un cadre médical: cliniMACS et CellSearch CTC test (détection de CTC) reposent sur ce mode de séparation. La technologie vendue par Miltenyi est la référence dans le domaine que ce soit pour des applications cliniques ou de recherche. Nous allons donc nous concentrer sur cette technologie.

La séparation Miltenyi a été mise au point au début des années 90. Le principe de séparation cellulaire est représenté en Figure 1-6<sup>28</sup>.

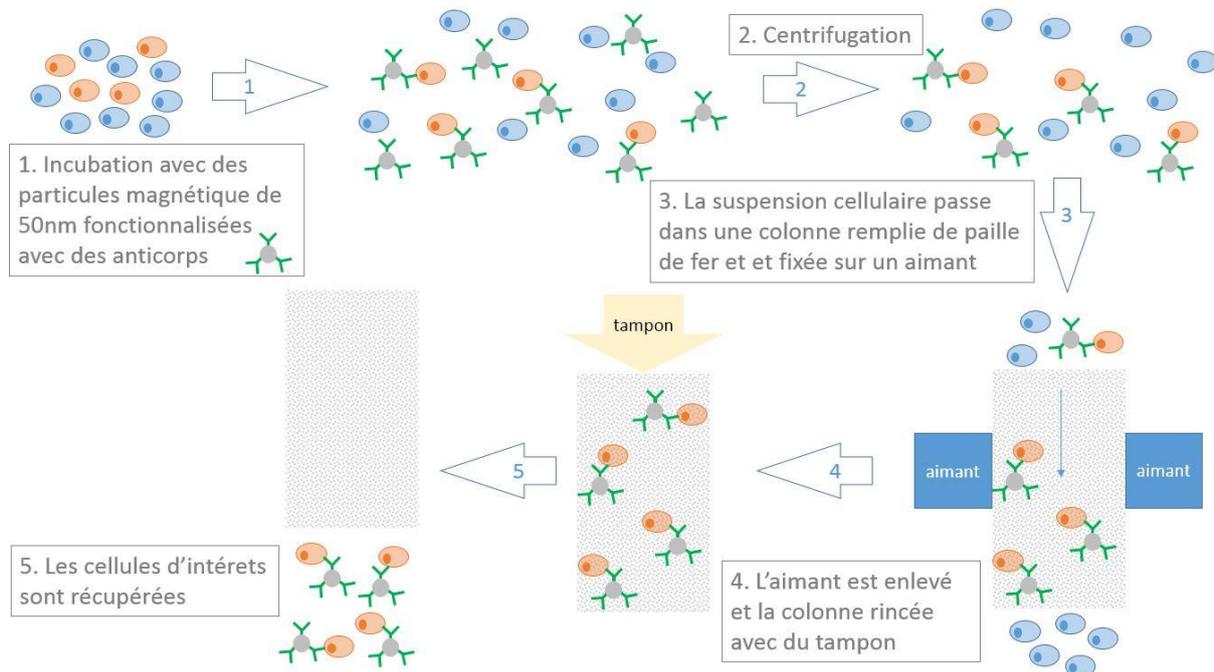


Figure 1-6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du tri immuno-magnétique MACS, développé par Miltenyi. La suspension cellulaire de départ contient plusieurs types cellulaires à purifier. Supposons que ce sont les cellules orange qui nous intéressent. La suspension cellulaire est incubée avec des particules magnétiques nanométriques sur lesquelles sont greffés des anticorps spécifiques des cellules orange. Les cellules orange interagissent avec les particules (il y en a une sur le schéma mais en réalité, plusieurs particules s'accrochent à une cellule) alors que les cellules bleues restent intactes. La suspension est centrifugée pour éliminer les particules magnétiques qui ne sont pas accrochées à une cellule. La colonne est disposée dans un aimant, et la suspension cellulaire transite à l'intérieur. Les cellules orange accrochées aux particules magnétiques restent dans la colonne, alors que les cellules bleues sont éliminées dans la fraction négative. Ensuite l'aimant est enlevé, la paille de fer perd son aimantation et les cellules oranges sont récupérées en rinçant la colonne avec du tampon dans la fraction positive.

La suspension cellulaire de départ contient plusieurs types cellulaires à purifier. Supposons que ce sont les cellules orange qui nous intéressent. La suspension cellulaire est incubée avec des particules magnétiques nanométriques sur lesquelles sont greffés des anticorps spécifiques des cellules orange. Les cellules orange interagissent avec les particules (il y en a une sur le schéma mais en réalité, plusieurs particules s'accrochent à une cellule) alors que les cellules bleues restent intactes. La suspension est centrifugée pour éliminer les particules magnétiques qui ne sont pas accrochées à une cellule. Des particules ayant un diamètre de 50nm ne peuvent pas interagir avec un aimant classique à l'extérieur de la suspension. C'est pour cela que la séparation magnétique se fait grâce à une colonne remplie de paille de fer (poreux magnétique). Cela permet de relayer la force magnétique plus près des particules. La colonne est disposée dans un aimant, et la suspension cellulaire transite à l'intérieur. Les cellules orange accrochées aux particules magnétiques restent dans la colonne, alors que les cellules bleues sont éliminées dans la fraction négative. Ensuite l'aimant est enlevé, la paille de fer

perd son aimantation et les cellules oranges sont récupérées en rinçant la colonne avec du tampon dans la fraction positive. Ce même processus peut aussi être utilisé pour enlever une population, c'est ce qu'on appelle la déplétion. Dans ce cas, les cellules d'intérêt sont les cellules bleues récupérées dans la fraction négative, et la suspension est déplétée en cellules orange.

Nous pouvons nous interroger sur l'intérêt de travailler avec des particules nanométriques plutôt que micrométriques car cela complique la séparation magnétique. Le premier avantage est qu'elles ont un coefficient de diffusion beaucoup plus important que des particules micrométriques. Cela va donc grandement favoriser la cinétique de rencontre entre les cellules et les particules. Or les cellules sont des objets assez peu browniens, donc le fait d'avoir des particules qui diffusent rapidement a un réel impact sur la première étape de la séparation. Le deuxième avantage est qu'il n'est pas nécessaire de les séparer des cellules. En effet ces particules ont une taille négligeable par rapport aux cellules et elles sont composées de dextran (un hydrogel biocompatible), et d'oxyde et d'hydroxyde de fer, composants de l'hémoglobine. En particulier elles ont une taille très inférieure à la taille des plus petits capillaires sanguins. Les cellules triées peuvent être injectées dans la circulation sanguine du patient (comme cela est le cas dans les greffes de CSH), la présence de ces particules ne risque pas d'obstruer un capillaire. Les cellules peuvent aussi être utilisées pour être mises en culture, analysées en cytométrie.... sans enlever les particules magnétiques.

Cette méthode de séparation a souvent été utilisée dans le cadre des greffes allogéniques de CSH pour limiter les GVHD, soit en sélectionnant les CSH, soit en déplétant en lymphocyte T. Quelques exemples de performances du CliniMACS (automate vendu par Miltenyi pour des applications cliniques) en termes de rendement et de pureté sont donnés dans le Tableau 1-1. Toutes ces études sont faites dans le cadre de transplantation allogénique de CSH.

| Référence                       | Rendement                    | Pureté                       |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Bitan 2005 <sup>29</sup>        | 70%<br>moyenne sur 7 essais  | 89%<br>moyenne sur 7 essais  |
| Ringhoffer 2004 <sup>30</sup>   | /                            | 98.7%                        |
| Donnell 2001 <sup>31</sup>      | 60%<br>moyenne sur 9 essais  | 92%<br>moyenne sur 9 essais  |
| Gaipa 2003 <sup>32</sup>        | 65%                          | 97.5%                        |
| Document fourni<br>par Miltenyi | 66%<br>moyenne sur 84 essais | 93%<br>moyenne sur 84 essais |

Tableau 1-1 : Tableau résumant les performances du tri réalisé par l'automate cliniMACS. Le tri récupère spécifiquement les CSH grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CD34. Le rendement correspond au nombre de cellules CD34 + récupérées dans la fraction positive normalisé par le nombre initial de cellules CD34 dans l'échantillon (déterminé par cytométrie). La pureté est le pourcentage de cellules CD34+ dans la fraction positive.

Globalement le rendement du tri est entre 60% et 70%, et la pureté au minimum de 90%. Ces performances ont permis à cette méthode d'être approuvée par la FDA pour le traitement de certains

cancers. Cependant à travers des discussions que nous avons eues avec des biologistes et des médecins, il apparait que le rendement du tri peut être très variable.

La durée de la séparation est autour de 100 minutes<sup>31,32</sup>. Les articles ne mentionnent pas de dysfonctionnement de l'appareil, ou de difficulté d'utilisation. Sur ces deux points l'automate de Miltenyi semble satisfaisant. Concernant le prix d'une séparation cliniMACS, il est autour de 12 000 euros. A cela il faut ajouter le coût d'un technicien expérimenté, et l'occupation d'un laboratoire de classe C pendant ½ journée. Le coût est donc important, et dans un pays où les soins de santé sont totalement à la charge des patients, cette technologie est inabordable pour une partie de la population.

Aujourd'hui c'est la technique de référence, en particulier pour les applications cliniques car c'est la seule méthode de séparation cellulaire autorisée aux Etats Unis et en Europe pour la thérapie cellulaire. Cependant ces autorisations concernent seulement le traitement de la leucémie aigüe myéloïde. C'est-à-dire une maladie grave et rare (moins de 1% des cancers) nécessitant de récupérer de l'ordre de  $1.10^8$  CSH. Si on se place maintenant dans le cadre de la médecine régénérative à grande échelle, le nombre de cellules à trier est beaucoup plus important et les maladies traitées peuvent être moins graves et toucher plus de personnes. Il s'agit dans ce cas de traiter  $1.10^{12}$  cellules souches ce qui nécessite de multiplier par 1000 les capacités actuelles de séparation de cliniMACS et en particulier le volume de la colonne contenant la paille de fer. Or comme nous l'avons vu les billes magnétiques étant petites, il faut faire appel à des techniques de séparation magnétique haut gradient. On peut donc s'interroger sur la possibilité de retenir les particules magnétiques avec une colonne plus grande c'est-à-dire avec une distance entre le centre de la colonne et l'aimant 1000 fois plus importante que maintenant. Un autre aspect est la toxicité des billes magnétiques. Il a été montré que les nanoparticules magnétiques modifient le comportement *in vitro* et *in vivo* de certaines cellules<sup>33</sup>. De plus l'accumulation de fer est liée au développement de certaines maladies neurodégénératives<sup>34</sup>. Dans le cas du traitement d'une leucémie, le bénéfice-risque des nanoparticules est en faveur de leur utilisation. Lorsque les thérapies cellulaires traiteront des maladies moins graves et affectant plus de personnes, la conclusion sera peut être différente.

#### 1.2.3.4. La chromatographie d'affinité de cellules

Une technique largement utilisée en chimie analytique, en particulier à l'échelle industrielle, est la chromatographie : la séparation de composés en fonction de leurs affinités pour la phase mobile dans laquelle ils sont dissouts et une phase stationnaire dans laquelle ils s'écoulent.

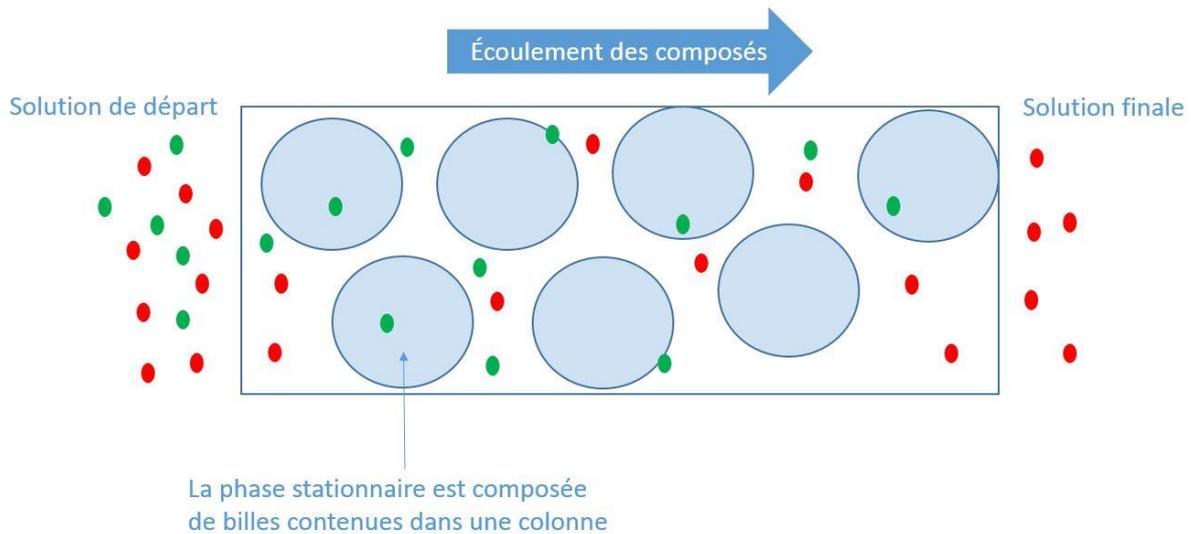


Figure 1-7 : Représentation schématique du principe de la chromatographie. La chromatographie est une technique de purification reposant sur la rétention différentielle de composés sur une phase stationnaire. La phase stationnaire est ici composée de billes contenues dans une colonne. Les composés s'écoulent dans la colonne. Les composés verts ont une affinité pour la phase stationnaire, ils sont donc retenus contrairement aux composés rouges.

Cette technique peut dans l'idée être facilement transposée au tri par affinité de cellules comme cela est représenté en Figure 1-7. Pour cela la phase stationnaire est fonctionnalisée avec des anticorps. La suspension cellulaire circule au sein de la colonne. Les cellules portant à leur surface l'antigène complémentaire de l'anticorps sont capturées sur la phase stationnaire, tandis que les autres cellules ne sont pas retenues. Cette méthode de capture rappelle un phénomène naturel : le recrutement des leucocytes sur la paroi des vaisseaux sanguins en cas d'inflammation. Les leucocytes sont en suspension dans le sang et circulent à une vitesse de quelques centaines de micromètres par seconde dans les vaisseaux. En cas d'inflammation les cellules endothéliales expriment à leur surface des sélectines qui sont capables d'interagir avec les leucocytes et de les ralentir. Ensuite grâce aux intégrines les leucocytes sont stoppés et migrent jusqu'au site de l'inflammation. Sur le principe la chromatographie est identique au recrutement des leucocytes : c'est l'immobilisation d'une cellule en mouvement par une interaction spécifique. La nature a eu le temps de se perfectionner pendant des millions d'années, les solutions choisies sont donc souvent optimales. En conséquence il nous semble pertinent de s'intéresser de plus près à cette technique de séparation.

La chromatographie d'affinité de cellules est une vieille idée qui a débuté autour des années 1980. En particulier en 1985, Lauffenburger, Hertz et Graves mettent en jeu leur connaissance sur l'adhésion spécifique entre cellules pour étudier la séparation des lymphocytes T du sang périphérique grâce à la chromatographie par affinité<sup>35</sup>. La même année, Berenson & al<sup>36</sup>, trient des cellules humaines par chromatographie d'affinité avec un rendement compris entre 10% et 50%, et une pureté de 70%. Il y a eu par la suite d'autres tentatives de tri cellulaire (cellules de mammifères ou bactéries) par

chromatographie<sup>37,38,39</sup> avec des particules magnétiques ou bien des lits fluidisés plutôt qu'un empilement compact de billes.

Ces dernières années des chromatographies utilisant les cryogels comme phase stationnaire<sup>40,41,42</sup> se sont développées. En particulier en 2010, des cellules souches hématopoïétiques et des lymphocytes B ont été isolés à partir d'une population de sang de cordon ombilical ou périphérique avec une pureté autour de 70% et un rendement pouvant atteindre 90%<sup>42</sup>. Cependant l'utilisation de ces matériaux dans le cadre de la médecine régénérative n'est pas évidente. Avec 1 mL de cryogel environ  $1.10^6$  cellules sont récupérées. Pour traiter  $1.10^{12}$  cellules (pour les banques de cellules thérapeutiques) il faut donc 1000 L de cryogel. Or la synthèse de cryogel demande un contrôle en température assez précis pour que la taille des pores et la tenue mécanique de la phase stationnaire soit optimale. Est-ce que la capacité de synthèse peut être multipliée par 1 million ? Pour le moment la réponse est non, dans l'article il est mentionné que la synthèse de plus de 20 mL de cryogel est problématique. De plus l'étape d'après, la fonctionnalisation, peut être rédhibitoire pour une utilisation thérapeutique car elle utilise de l'éthylène diamine qui est un produit toxique.

La libération des cellules est un enjeu du tri cellulaire par chromatographie d'affinité. Les deux techniques utilisées et souvent associées pour libérer les cellules de la phase stationnaire, sont l'application d'une force mécanique et l'utilisation d'un compétiteur chimique qui a une grande affinité pour une des deux molécules intervenant dans l'interaction spécifique<sup>41,37</sup>. La force mécanique peut être une compression de la phase stationnaire comme dans le cas de l'utilisation des cryogel<sup>42</sup>, ou bien les billes sont sorties de la colonne et mises à agiter dans un becher<sup>39</sup>, ou la colonne est agitée sur un vortex<sup>43</sup>... L'application d'une force mécanique permet de libérer jusqu'à 90% des cellules capturées mais elle altère souvent la viabilité des cellules<sup>37,39,43</sup>. L'utilisation d'un compétiteur chimique est une méthode plus douce pour libérer les cellules mais la fraction de cellules libérées est souvent insuffisante.

Malgré son fort développement dans la chimie analytique ce n'est pas une technique très répandue dans le monde du tri cellulaire. Or en plus d'imiter un phénomène naturel, c'est une technologie prometteuse pour le traitement de volume à échelle industrielle. D'ailleurs dans les années 90, une start-up américaine, CellPro, a développé une chromatographie d'affinité pour des applications cliniques<sup>36,44</sup>. C'est la première méthode de séparation cellulaire à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché en Europe en 1993. Mais des problèmes de propriété industrielle ont entraîné l'arrêt de la vente de ce produit. Aujourd'hui cette technologie est donc absente du marché du tri cellulaire pour des applications thérapeutiques. Nous avons donc réfléchi au développement d'une technique de tri

cellulaire reposant sur la chromatographie d'affinité, dans le contexte du développement des thérapies cellulaires (tel que présenté dans 1.1.1.2).

Je vais maintenant vous décrire la méthode de tri développée durant cette thèse réalisée en collaboration avec l'entreprise Bertin Technologies dans le cadre du dispositif CIFRE, et d'un appel à projet de l'ANR : Recherche finalisée sur les cellules souches.

### 1.3. Présentation de la méthode de tri cellulaire étudiée

#### 1.3.1. Principe de la technique de tri

Les objectifs de cette thèse sont de développer une technique de tri cellulaire par affinité pour des applications cliniques, pouvant traiter des volumes importants (quelques centaines de litres), et industrialisable. La méthode que nous proposons est schématisée en Figure 1-8.

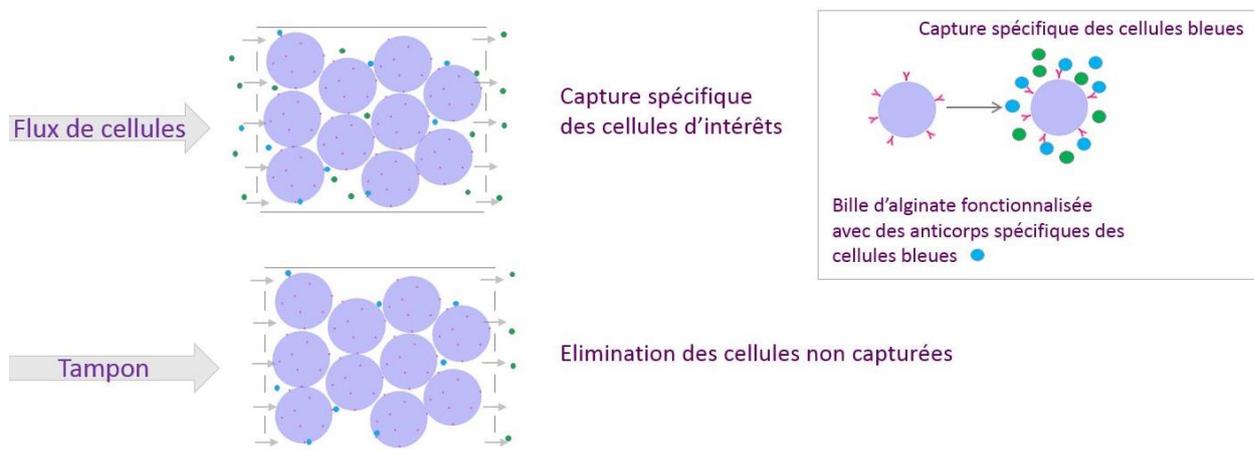


Figure 1-8 : Représentation schématique de la technique de tri développée durant cette thèse. Le principe est celui de la chromatographie par affinité. Pour cela des billes d'alginate fonctionnalisées avec des anticorps sont contenues dans une colonne. La suspension cellulaire de départ traverse la colonne. Les cellules ayant à leur surface l'antigène complémentaire de l'anticorps présent sur les billes, sont retenues dans la colonne. La colonne est rincée avec une solution tampon afin d'éliminer les cellules restées en solution.

La suspension cellulaire de départ contenant différents types cellulaires s'écoule dans une colonne remplie de billes fonctionnalisées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les cellules d'intérêt. Les cellules ne portant pas l'antigène ciblé restent en solution, alors que les cellules d'intérêt se fixent à la surface des billes. La colonne est rincée avec une solution tampon afin d'éliminer les cellules restées en solution.

Les billes utilisées ne sont pas solides mais ce sont des billes poreuses constituées d'alginate, un copolymère naturel issu d'algues brunes marines. Il est composé de deux types de sucres : le  $\beta$ -D-mannuronate (noté M) et le  $\alpha$ -L-gulonate (noté G) représenté en Figure 1-9.

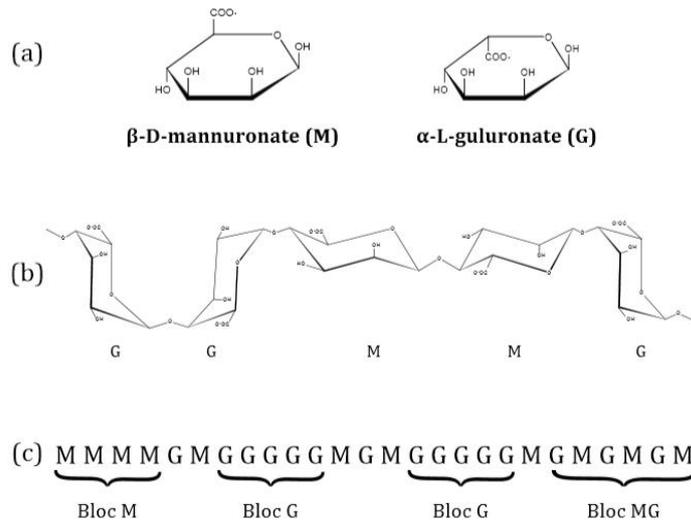


Figure 1-9: Figure issue de Rolland, L.<sup>45</sup> Structure et composition de l'alginate. (a) Monomère composant l'alginate. (b) Conformation des chaînes (c) Exemple de distribution des blocs au sein du polymère.

Un brin d'alginate est constitué de blocs G, de blocs M et de blocs mixtes M et G. Comme on le voit sur la figure ci-dessus de nombreuses fonctions acides carboxyliques sont réparties le long d'une chaîne. Lorsque ces fonctions sont ionisées négativement la présence d'ions divalents crée des points de réticulation physique par interactions électrostatiques avec les fonctions COO<sup>-</sup> et entraîne une transition sol-gel. Le cation couramment utilisé au laboratoire est le calcium. Ces points de réticulation se font entre deux blocs G, dans une configuration « boîte à œuf ». Le gel formé est composé des brins d'alginate gonflés par une grande quantité d'eau. Étonnamment ce gel est stable dans l'eau pure<sup>46</sup>. Par contre il est déstabilisé en présence de cations monovalents et de chélatant du calcium comme l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) ou le citrate. La taille des pores du gel d'alginate est de l'ordre de la dizaine de nanomètre <sup>46</sup>, les cellules sont donc capturées en surface et ne pénètrent pas dans la bille.

La Figure 1-8 ne présente pas le tri dans son intégralité, il faut récupérer les cellules retenues à la surface des billes. Pour cela la propriété de déstabilisation du gel d'alginate en présence de chélatant du calcium est utilisée, comme cela est représenté en Figure 1-10. A la fin du processus de tri, il reste de l'alginate sur les cellules. A priori cela n'est pas un problème car ce matériau est déjà utilisé dans le milieu médical comme nous allons le voir dans la suite.

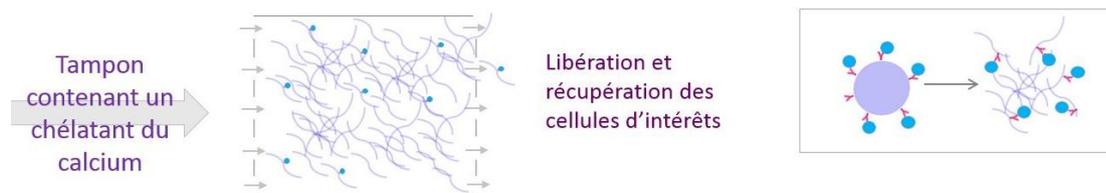


Figure 1-10 : Représentation schématique de la dernière étape du tri cellulaire. Les cellules retenues spécifiquement à la surface des billes d'alginate sont libérées et récupérées. Pour cela la colonne est remplie avec une solution contenant un chélatant du calcium qui déstabilise le gel d'alginate composant les billes.

L'alginate est un des points fort de la méthode proposée. D'ailleurs ce matériau a déjà été utilisé pour isoler des cellules dans des puces microfluidiques<sup>47</sup>. Cet hydrogel est historiquement présent dans l'industrie alimentaire en tant que gélifiant. Il trouve aujourd'hui de nombreuses applications dans le domaine médical, comme excipient dans les médicaments, pour les empreintes dentaires, ou bien comme pansement chirurgical<sup>48</sup>. C'est un matériau biocompatible, et non immunogène. Cela permet même son utilisation pour la vectorisation de médicaments ou de cellules. Le principal défaut de l'alginate est qu'il n'est pas naturellement clivé et que sa dégradation dans le corps humain n'est pas contrôlée. Des études ont montré qu'on peut améliorer ce point en jouant en outre sur la masse molaire ou bien sur la taille de blocs G. C'est donc globalement un matériau de choix dans le cadre d'une application thérapeutique.

En outre il est connu que ce matériau n'adhère pas naturellement aux cellules<sup>49</sup>. Cette caractéristique est généralement considérée comme un défaut car on souhaite utiliser l'alginate comme support pour la culture cellulaire, mais dans notre cas cela va favoriser une bonne pureté de la séparation.

Tout cela nous indique aussi qu'il existe un approvisionnement en alginate répondant aux critères de qualité du domaine médical et que ce n'est pas un matériau dont l'utilisation à grande échelle pose problème.

Concernant la dernière étape du tri, la libération des cellules nécessite l'utilisation de citrate ou d'EDTA pour dissoudre le gel d'alginate. Ces produits sont actuellement utilisés en tant qu'anticoagulants dans les poches de sang. Leur utilisation ne pose donc pas de problème pour une application clinique.

Afin de développer une chromatographie cellulaire efficace pour des applications industrielles nous sommes intéressés aux mécanismes qui gouvernent la capture spécifique des cellules dans un empilement de billes. Cette capture repose sur l'interaction spécifique entre un anticorps et un antigène que nous allons présenter dans la partie suivante.

### 1.3.2. Description de l'interaction spécifique ligand-récepteur

L'interaction spécifique intervient dans de nombreux domaines de la biologie comme l'adhésion, la signalisation ou la reconnaissance. Elle permet par exemple au système immunitaire d'identifier et d'éliminer un corps étranger. Dans un tout autre contexte, elle est responsable de la transmission de l'information entre deux neurones au niveau de la synapse grâce à un neurotransmetteur. L'interaction spécifique est donc primordiale en biologie.

Je vais commencer par présenter l'interaction spécifique dans un cadre physico-chimique, et c'est plus précisément la cinétique d'association qui va nous intéresser.

#### 1.3.2.1. Interaction spécifique entre deux molécules en solution

La liaison spécifique entre un ligand L et un récepteur R repose sur des interactions non covalentes précisément localisées de type Van der Waals (VDW), hydrophobes, liaisons hydrogènes et électrostatiques. L'énergie associée est de l'ordre de  $10 kT^{50}$ . Cette interaction est donc réversible grâce à l'agitation thermique.

La cinétique d'association du ligand et du récepteur en solution se décompose en deux étapes comme cela est représenté en Figure 1-11 : le phénomène de transport qui amène les deux entités à proximité puis la formation des interactions non covalentes formant le lien. On introduit la notion de paire préactive L-R qui est l'intermédiaire formé entre ces deux étapes. Comme cela est représenté en Figure 1-11 on associe une constante cinétique à chaque étape.

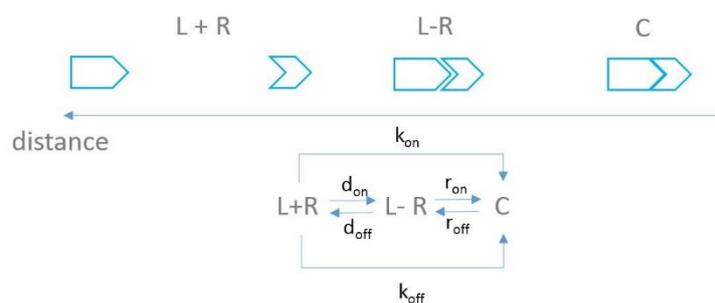


Figure 1-11 : Représentation schématique des étapes permettant la formation d'un lien spécifique entre un ligand (L) et un récepteur (R). La première étape est le transport des deux molécules à proximité. Ensuite elles forment une paire préactive. Puis lorsque les liens non covalents sont formés entre L et R, le complexe est noté C.

Dans le cadre de l'hypothèse classique supposant que la concentration en paires préactives L-R est dans un régime stationnaire, les constantes cinétiques s'écrivent de la manière suivante :

$$k_{on} = \frac{r_{on} * d_{on}}{r_{on} + d_{off}} \quad (1-1)$$

$$k_{\text{off}} = \frac{r_{\text{off}} \cdot d_{\text{off}}}{r_{\text{on}} + d_{\text{off}}} \quad (1-2)$$

On distingue deux régimes cinétiques limites :

- $r_{\text{on}} \gg d_{\text{off}}$ , la réaction est limitée par le transport et  $k_{\text{on}} = d_{\text{on}}$
- $r_{\text{on}} \ll d_{\text{off}}$  la réaction est limitée par l'étape de réaction chimique et  $k_{\text{on}} = \frac{d_{\text{on}}}{d_{\text{off}}}$

Expérimentalement on constate que quel que soit le couple considéré (anticorps-antigène, cadhérines, intégrines...) les constantes cinétiques d'association  $k_{\text{on}}$  sont quasiment toutes de l'ordre de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Il est donc légitime de penser que l'étape cinétiquement déterminante est le transport. En effet dans le cas de molécules cette étape est assurée par la diffusion thermique. En 1917, Smoluchowski a démontré que la constante cinétique de transport par diffusion entre deux sphères s'exprime de la manière suivante<sup>51</sup>:

$$d_{\text{on}} = 4 * \pi * (R_L + R_R) * (D_L + D_R) \quad (1-3)$$

Avec  $D_R$  et  $D_L$  les coefficients de diffusion des espèces L et R, et  $R_R$  et  $R_L$  les rayons de R et L. Les coefficients de diffusion s'expriment selon la relation d'Einstein :

$$D_i = \frac{kT}{6\pi\mu R_i} \quad (1-4)$$

La cinétique de transport dépend donc seulement de la taille des espèces qui est du même ordre de grandeur pour les tous les couples ligand-récepteur, entre 1 et 10 nm. A température ambiante, dans un milieu aqueux la constante cinétique de Smoluchowski est estimée à  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Expérimentalement, la cinétique est 1000 fois moins rapide que ce qui est prévue par Smoluchowski. La différence entre cette constante théorique et les constantes expérimentales est interprétée par une contrainte géométrique. En effet les ligands et récepteurs ne sont pas isotropiquement réactifs, ils interagissent via des surfaces limitées. Par exemple un même antigène peut être reconnu par différents anticorps, chacun se fixant sur une partie différente, appelée épitope. Pour prendre en compte cet aspect de la rencontre Janin & al<sup>52</sup> ajoute un paramètre d'orientation, qui est la probabilité d'avoir une paire correctement orientée (cf. Figure 1-12).

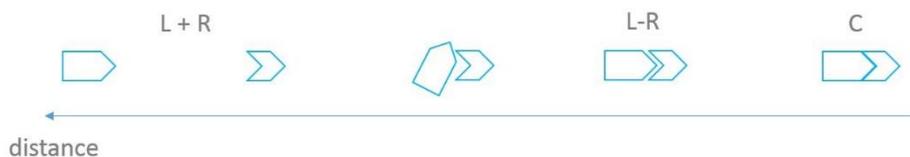


Figure 1-12 : Représentation schématique des étapes permettant la formation d'un lien spécifique entre un ligand (L) et un récepteur (R). La première étape est le transport des deux molécules à proximité. Ensuite comme L et R ne sont pas isotropiquement réactifs, ils doivent se rencontrer avec la bonne orientation afin de former une paire préactive. Puis lorsque les liens non covalents sont formés entre L et R, le complexe est noté C.

Nous venons de présenter les bases de l'interaction spécifique dans le cas le plus simple, c'est à dire en solution. Cependant lors de la chromatographie d'affinité, l'anticorps est fixé sur des billes et l'antigène sur la membrane des cellules, ce qui modifie la cinétique de réaction.

### 1.3.2.2. Interaction spécifique entre deux molécules attachées à des surfaces

La réactivité des protéines ancrées dans des surfaces est un sujet grandement étudié car il décrit de nombreux phénomènes biologiques tels que le recrutement des leucocytes lors de l'inflammation. Cependant c'est un sujet complexe et il est compliqué de caractériser théoriquement et expérimentalement la cinétique d'association de molécules liées à des surfaces<sup>53</sup>. Dans ce cas les molécules ne diffusent plus librement en solution, elles sont confinées sur une surface et on parle alors de réaction à deux dimensions.

D'un point de vue théorique Bell en 1978 a établi un modèle permettant de déduire les constantes d'association en 2D à partir de celles en 3D<sup>54</sup> et des constantes de diffusion en deux dimensions. Cependant ce formalisme ne suffit pas à décrire la réalité<sup>55</sup>, et de nombreux autres paramètres jouent des rôles comme l'orientation des molécules sur la surface et la manière dont elles sont ancrées<sup>56</sup>.

La détermination expérimentale des constantes d'association est difficile. Tout d'abord lorsque les surfaces s'approchent plusieurs liens peuvent se former. Il faut alors relier la mesure à la constante d'association d'un seul lien ce qui est compliqué. Il est toutefois possible de travailler à de faibles concentrations en ligand et récepteur pour s'assurer de la formation d'un seul lien. De nombreuses mesures se font en observant des cellules en contact avec une surface fonctionnalisée avec des ligands en présence d'un écoulement (chambre à flux)<sup>57</sup>. L'adhésion est liée à un arrêt des cellules, cependant la définition d'un arrêt est compliquée, seuls les arrêts assez longs pour être observés sont mesurés et il est compliqué de démontrer que l'arrêt est bien dû à la formation d'un seul lien. De plus lorsque les mesures sont réalisées avec des cellules, de nombreux paramètres influencent la cinétique d'association et en particulier la structure des membranes. Finalement ces mesures nécessitent de connaître et/ou de maîtriser des paramètres difficilement accessibles tels que l'aire de contact entre les surfaces, les densités surfaciques de ligands et récepteurs, les coefficients de diffusion en 2D, la distance entre les surfaces, le temps de contact.... En parallèle de la quantification des constantes d'association, cette approche de chambre à flux a permis une étude intéressante des constantes de dissociation.

Globalement les cinétiques d'interaction entre des protéines fixées à des surfaces sont largement ralenties par rapport aux réactions en 3D. Cette différence est liée à la diffusion en 2D qui est moins efficace que celle en 3D. Par contre la cinétique de dissociation est comparable en 2D et en solution<sup>58</sup>.

La chromatographie cellulaire d'affinité a été appréhendée par Lauffenburger dans ce contexte d'étude de l'adhésion spécifique. Il étudie en particulier l'effet de la vitesse d'écoulement des cellules dans la colonne chromatographique sur la capture spécifique. Il constate qu'en augmentant la vitesse, il devient moins probable de capturer une cellule. La description du phénomène et l'interprétation des données expérimentales portent sur la probabilité<sup>35</sup>, ou le taux d'adhésion<sup>59</sup> lorsqu'une collision a lieu entre une cellule et une bille. Ces grandeurs dépendent du nombre de ligands et de récepteurs, de l'affinité ligand-récepteur, de leurs mobilités, de l'aire de contact, de la déformabilité des cellules et des interactions non spécifiques entre les deux surfaces comme représenté en Figure 1-13.

Figure 1-13 : Représentation schématique d'une cellule interagissant avec une surface grâce à la formation de liens spécifiques<sup>35</sup>. Les principaux paramètres influençant la formation des liens sont représentés.

Par contre l'influence de la première étape de transport des cellules à proximité de la surface des billes est considérée comme négligeable. Une raison pour négliger cette étape, pourrait être que ce n'est pas l'étape cinétiquement limitante, et que la capture est principalement gouvernée par la formation du lien. Nous allons donc nous intéresser au transport des cellules à la surface des billes.

### 1.3.2.3. Etape de rencontre en chromatographie d'affinité cellulaire

Nous souhaitons estimer la cinétique de rencontre par diffusion entre des cellules et des billes de quelques centaines de microns, telles que celles utilisées dans la chromatographie d'affinité. Le rayon des billes est fixé à 200  $\mu\text{m}$  et le rayon des cellules à 4  $\mu\text{m}$ . La constante cinétique  $d_{on}$  calculée selon la formule de Smoluchowski (1-3) donne :

$$d_{on} = 1.10^{-16} \text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \quad (1-5)$$

Cette constante est du même ordre de grandeur que la constante caractérisant la cinétique de rencontre entre des cellules et des particules de 50 nm (comme celles utilisées par MACS). Ce qui est surprenant. Si on écrit la constante de rencontre lorsque les deux objets ont une taille très différente  $R_1 \ll R_2$ , on trouve à partir de l'équation (1-3):

$$d_{on} = \frac{2kT}{3\mu} \frac{R_p}{R_A} \quad (1-6)$$

C'est la différence de taille entre les deux objets qui est importante. L'objet le plus petit diffuse jusqu'à l'objet le plus gros et la rencontre est d'autant plus probable que celui-ci a une taille importante. Dans le cas du tri par MACS, les particules nanométriques diffusent rapidement, mais la taille des cibles, les cellules, est petite. Dans le cas de la chromatographie c'est la situation inverse, les cellules diffusent lentement mais les cibles, les billes, ont une taille est importante. Le transport par diffusion serait donc aussi efficace dans la technique MACS que pour la chromatographie ? En fait ce n'est pas le cas, car le nombre de rencontres par unité de temps et de volume par diffusion dépend aussi des concentrations des différents objets. Le temps caractéristique de rencontre par diffusion entre deux espèces A et B, dans le cas où  $[B] \gg [A]$  est donné par :

$$\tau = \frac{1}{d_{on}*[B]} \quad (1-7)$$

On se place dans le cas d'un empilement compact de billes, c'est-à-dire que 60% du volume total est occupé par les billes. La concentration correspondante est  $2.10^4$  billes.mL<sup>-1</sup>. On considère une concentration cellulaire typique autour de  $5.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Le temps caractéristique de rencontre par diffusion en chromatographie d'affinité est donné par :

$$\tau = \frac{1}{d_{on}*[cellules]} = 2.10^3 \text{ s} \quad (1-8)$$

Une concentration raisonnable en particules magnétiques de 50 nm est le nanomolaire, c'est-à-dire  $6.10^{11}$  particules.mL<sup>-1</sup>. Dans ce cas le temps caractéristique de rencontre par diffusion entre les cellules et les particules est :

$$\tau = \frac{1}{d_{on}*[particules]} = 2.10^{-2} \text{ s} \quad (1-9)$$

La cinétique de rencontre par diffusion entre les cellules et les billes en chromatographie est donc très lente lorsqu'elle est comparée à la rencontre par diffusion avec des particules nanométriques.

La présence de l'écoulement est aussi un moyen d'emmener les cellules à proximité des billes. Cependant d'un point de vue hydrodynamique, lorsque deux surfaces se rapprochent, une force visqueuse en  $\frac{R_C}{h}$  apparaît, avec h la distance entre la cellule et la bille et  $R_C$  le rayon de la cellule. Cette

force est liée au cisaillement du fluide entre la particule et la surface de la bille, comme cela est représenté en Figure 1-14.

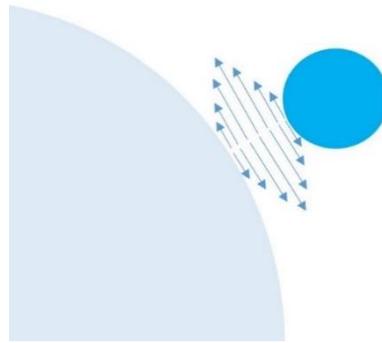


Figure 1-14 : Représentation schématique de l'interaction hydrodynamique entre la cellule et la bille lorsque les deux surfaces se rapprochent.

Cette force s'oppose au mouvement de la cellule vers la surface de la bille. Elle devient importante lorsque la distance entre les billes et les cellules est de l'ordre de la taille des cellules, c'est-à-dire quelques micromètres. A cette distance, les surfaces sont trop éloignées pour que les liaisons spécifiques puissent se former. Cependant expérimentalement on constate que des liens se forment, il y a donc d'autres forces qui viennent contrebalancer cette force hydrodynamique. Le transport des cellules à proximité des billes grâce à l'écoulement est donc un phénomène complexe qui n'a rien d'évident.

La description de la capture cellulaire par des billes de quelques centaines de microns ne peut pas se réduire aux phénomènes d'adhésion lorsque les cellules sont à proximité des billes. Et en particulier il n'y a aucune raison de faire l'hypothèse que le transport n'est pas cinétiquement limitant dans la capture des cellules. Afin de décrire correctement la capture par chromatographie et d'optimiser cette technique de tri il faut étudier toutes les étapes : le transport et la formation des liens spécifiques.

## 1.4. Conclusion

Pour clôturer ce chapitre résumons les idées principales développées.

La médecine régénérative est un domaine en plein essor, sur lequel de nombreux espoirs sont fondés afin de traiter des maladies incurables actuellement. Son développement à grande échelle est contraint par de nombreux défis scientifiques et technologiques dont le tri cellulaire fait partie. En effet lors de la production de cellules différenciées, un certain nombre de cellules gardent leur caractère pluripotent. Ces cellules indifférenciées ont un potentiel tumorigène et doivent donc être éliminées.

Il existe de nombreuses techniques de tri cellulaire, dont certaines utilisées pour des applications thérapeutiques. Cependant aucune à ce jour n'est capable de trier des cellules à l'échelle industrielle.

Nous proposons donc de développer une technique de tri par affinité pour des applications cliniques, pouvant aussi traiter des volumes importants (jusqu'à quelques centaines de litres), et industrialisable. Nous avons pris en compte ces contraintes en amont. Et les principaux composants de la technique présentée (alginate, anticorps, citrate...) sont déjà utilisés pour des applications thérapeutiques. De plus le principe du tri, la chromatographie, est déjà utilisé à échelle industrielle pour purifier des molécules.

Le phénomène à la base de la chromatographie est l'adhésion spécifique. Comme nous venons de le voir c'est un phénomène très complexe que l'on peut décrire en deux étapes : le transport des molécules à proximité, puis la formation des liens.

Jusqu'à présent les études sur la chromatographie cellulaire d'affinité ont seulement considéré la seconde étape, c'est-à-dire la réaction entre les deux molécules. Cependant pour décrire correctement cette technique de tri il faut aussi prendre en compte la première qui est le transport.

Durant cette thèse nous avons donc choisi de nous intéresser aux deux étapes, c'est-à-dire au rapprochement des objets, et à la formation du lien. Si on étudie ces deux phénomènes en même temps nous allons réaliser une mesure globale et nous ne pourrons pas dissocier la part de chacun. Nous avons donc étudié le transport et la formation du lien séparément.

Je vais maintenant présenter l'étude expérimentale que j'ai menée sur l'étape de transport.

## 1.5. Bibliographie

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
2. Abbasalizadeh, S. & Baharvand, H. Technological progress and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1600–1623 (2013).
3. Menasché, P. *et al.* Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur. Heart J.* **36**, 743–750 (2015).

4. Hou, P. *et al.* Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* **341**, 651–654 (2013).
5. Cyranoski, D. Stem cells reprogrammed using chemicals alone. *Nat. News* doi:10.1038/nature.2013.13416
6. J, G. Stem cell cryopreservation. *J. Infus. Chemother.* **6**, 23–27 (1995).
7. Rowley, S. D. Hematopoietic Stem Cell Cryopreservation: A Review of Current Techniques. *J. Hematother.* **1**, 233–250 (1992).
8. Urbano-Ispizua, A. *et al.* Rapid Engraftment Without Significant Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Transplantation of CD34+ Selected Cells From Peripheral. *Blood* **89**, 3967–3973 (1997).
9. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34+progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Publ. Online 26 April 2001 Doi101038sjbmt1702996* **27**, (2001).
10. Bensinger, W. I. *et al.* Transplantation of allogeneic CD34+ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy. *Blood* **88**, 4132–4138 (1996).
11. Koh, L.-P. & Chao, N. Haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **42**, S60–S63 (2008).
12. Paterlini-Brechot, P. & Benali, N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* **253**, 180–204 (2007).
13. Riethdorf, S. *et al.* Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer: A Validation Study of the CellSearch System. *Clin. Cancer Res.* **13**, 920–928 (2007).
14. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **133**, 157–165 (1984).
15. Dao, M. A. & Nolta, J. A. CD34: to select or not to select? That is the question. *Leukemia* **14**, 773–776 (2000).

16. Boyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood - Isolation of Mononuclear Cells by One Centrifugation and of Granulocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **S 21**, 77–& (1968).
17. Diogo, M. M., da Silva, C. L. & Cabral, J. M. S. Separation technologies for stem cell bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2699–2709 (2012).
18. Ji, H. M. *et al.* Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. *Biomed. Microdevices* **10**, 251–257 (2007).
19. Vona, G. *et al.* Isolation by size of epithelial tumor cells - A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* **156**, 57–63 (2000).
20. Karimi, A., Yazdi, S. & Ardekani, A. M. Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics. *Biomicrofluidics* **7**, 021501 (2013).
21. Roda, B. *et al.* Human lymphocyte sorting by gravitational field-flow fractionation. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 137–145 (2008).
22. Plouffe, B. D., Murthy, S. K. & Lewis, L. H. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Rep. Prog. Phys.* **78**, 016601 (2015).
23. Bonner, W., Sweet, R., Hulett, H. & Herzenbe.la. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Rev. Sci. Instrum.* **43**, 404–& (1972).
24. Molday, R., Yen, S. & Rembaum, A. Application of Magnetic Microspheres in Labeling and Separation of Cells. *Nature* **268**, 437–438 (1977).
25. Isolation of CD34+ cells from blood stem cell components using the Baxter Isolex system. *Publ. Online 15 June 1998 Doi101038sjbmt1701257* **21**, (1998).
26. Jing, Y. *et al.* Blood progenitor cell separation from clinical leukapheresis product by magnetic nanoparticle binding and magnetophoresis. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 1139–1154 (2007).
27. Pope, N. M., Alsop, R. C., Chang, Y.-A. & Smith, A. K. Evaluation of magnetic alginate beads as a solid support for positive selection of CD34+ cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 449–457 (1994).

28. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231–238 (1990).
29. Bitan, M. *et al.* Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133+-purified stem cells. *Exp. Hematol.* **33**, 713–718 (2005).
30. Ringhoffer, M. *et al.* CD34+ cell selection of peripheral blood progenitor cells using the CliniMACS device for allogeneic transplantation: clinical results in 102 patients. *Br. J. Haematol.* **126**, 527–535 (2004).
31. O'Donnell, P. V. *et al.* CD34 selection using three immunoselection devices: comparison of T-cell depleted allografts. *Cytotherapy* **3**, 483–488 (2001).
32. Gaipa, G. *et al.* Allogeneic bone marrow stem cell transplantation following CD34+ immunomagnetic enrichment in patients with inherited metabolic storage diseases. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 857–860 (2003).
33. Farrell, E. *et al.* Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1076–1081 (2008).
34. Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M. A., Journeay, W. S. & Laurent, S. Effect of nanoparticles on the cell life cycle. *Chem. Rev.* **111**, 3407–3432 (2011).
35. Hammer, D. A., Linderman, J. J., Graves, D. J. & Lauffenburger, D. A. Affinity Chromatography for Cell Separation: Mathematical Model and Experimental Analysis. *Biotechnol. Prog.* **3**, 189–204 (1987).
36. Berenson, R. J., Bensinger, W. I. & Kalamasz, D. Positive selection of viable cell populations using avidin-biotin immunoabsorption. *J. Immunol. Methods* **91**, 11–19 (1986).
37. Putnam, D. D., Namasivayam, V. & Burns, M. A. Cell affinity separations using magnetically stabilized fluidized beds: Erythrocyte subpopulation fractionation utilizing a lectin-magnetite support. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 650–665 (2003).
38. Brewster, J. D. Isolation and concentration of Salmonellae with an immunoaffinity column. *J. Microbiol. Methods* **55**, 287–293 (2003).

39. Ujam, L. B. *et al.* Isolation of monocytes from human peripheral blood using immuno-affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 554–566 (2003).
40. Arvidsson, P. *et al.* Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J. Chromatogr. A* **977**, 27–38 (2002).
41. Dainiak, M. B., Galaev, I. Y. & Mattiasson, B. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *J. Chromatogr. A* **1123**, 145–150 (2006).
42. Kumar, A. & Srivastava, A. Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. *Nat. Protoc.* **5**, 1737–1747 (2010).
43. Ghetie, V., Mota, G. & Sjöquist, J. Separation of cells by affinity chromatography on SpA-sepharose 6MB. *J. Immunol. Methods* **21**, 133–141 (1978).
44. Berenson, R. J. & Bensinger, W. I. Method for Immunoselection of Cells Using Avidin and Biotin. (1993). at <[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19930706&D=B=EPODOC&locale=en\\_EP&CC=US&NR=5225353A&KC=A&ND=4](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19930706&D=B=EPODOC&locale=en_EP&CC=US&NR=5225353A&KC=A&ND=4)>
45. Rolland, L. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013). at <<https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00919083/document>>
46. Rolland, L., Santanach-Carreras, E., Delmas, T., Bibette, J. & Bremond, N. Physicochemical properties of aqueous core hydrogel capsules. *Soft Matter* **10**, 9668–9674 (2014).
47. Hatch, A., Hansmann, G. & Murthy, S. K. Engineered Alginate Hydrogels for Effective Microfluidic Capture and Release of Endothelial Progenitor Cells from Whole Blood. *Langmuir* **27**, 4257–4264 (2011).
48. Augst, A. D., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol. Biosci.* **6**, 623–633 (2006).
49. Rowley, J. A., Madlambayan, G. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**, 45–53 (1999).
50. Zhou, H.-X. Rate theories for biologists. *Q. Rev. Biophys.* **43**, 219–293 (2010).

51. Smoluchowski, M. Attempt to derive a mathematical theory of coagulation kinetics in colloidal solutions (In German: Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetic kolloider losungen). *Z. Phys. Chem* 129–168 (1917).
52. Janin, J. The kinetics of protein-protein recognition. *Proteins-Struct. Funct. Genet.* **28**, 153–161 (1997).
53. Baudry, J., Bertrand, E., Lequeux, N. & Bibette, J. Bio-specific recognition and applications: from molecular to colloidal scales. *J. Phys. Condens. Matter* **16**, R469 (2004).
54. Bell, G. I. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *Science* **200**, 618–627 (1978).
55. Cohen-Tannoudji, L. *Cinétique de réactions ligand-récepteur en surface : étude fondée sur l'utilisation de colloïdes magnétiques*. (Paris 6, 2006). at <<http://www.theses.fr/2006PA066157>>
56. Cohen-Tannoudji, L. *et al.* Measuring the kinetics of biomolecular recognition with magnetic colloids. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 108301 (2008).
57. Pierres, A., Benoliel, A.-M. & Bongrand, P. Measuring bonds between surface-associated molecules. *J. Immunol. Methods* **196**, 105–120 (1996).
58. Dustin, M. L., Bromley, S. K., Davis, M. M. & Zhu, C. Identification of Self Through Two-Dimensional Chemistry and Synapses. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 133–157 (2001).
59. Hammer, D. A. & Lauffenburger, D. A. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* **52**, 475–487 (1987).

---

## 2. Etude de l'étape de transport permettant aux cellules d'atteindre la surface des billes

---

Dans ce chapitre je vais présenter l'étude expérimentale que nous avons menée sur un système modèle afin de quantifier et d'étudier les phénomènes permettant aux cellules d'atteindre la surface des billes. Pour cela nous avons développé un dispositif expérimental que je vais présenter dans un premier temps. Puis j'exposerai les résultats obtenus et l'interprétation qui en découle.

### 2.1. Etude expérimentale de l'étape de transport

#### 2.1.1. Système modèle

##### 2.1.1.1. Interaction entre les billes d'alginate et les particules

Nous souhaitons dans cette partie étudier l'étape de transport, c'est-à-dire les mécanismes permettant aux cellules d'être à une distance des billes où la formation du lien peut avoir lieu. Nous appelons ce phénomène rencontre. Nous devons donc concevoir une expérience où le phénomène limitant est la rencontre, et non pas la formation du lien.

Les éléments cinétiquement limitants lors de la formation d'un lien spécifique peuvent être :

- La densité surfacique de molécules complémentaires (ligand et récepteur). Si elle est trop faible, une rencontre peut avoir lieu entre des zones ne contenant pas l'une des deux molécules nécessaires à la formation du lien
- La nécessité que le ligand et le récepteur se rencontrent avec une orientation géométrique permettant la formation du lien. Cette contrainte dépend de la manière dont les molécules sont greffées sur les surfaces<sup>1</sup>.
- La présence d'une énergie d'activation due à une interaction non spécifique répulsive entre les surfaces sur lesquelles sont greffés le ligand et le récepteur.

Ces différents éléments peuvent faire qu'une rencontre n'aboutisse pas à la formation d'un lien. Il faut donc s'en affranchir autant que possible afin que notre expérience nous permette de sonder la cinétique de rencontre. De plus la distance à laquelle le lien se forme doit être du même ordre de grandeur que la distance à laquelle se forment les liens spécifiques entre des molécules greffées à des surfaces, c'est-à-dire quelques nanomètres.

Afin de répondre à tous ces critères nous avons fait le choix d'étudier la capture de particules micrométriques par des billes d'alginate. Nous avons mis au point des conditions physico-chimiques telles que les particules adhèrent aux billes d'alginate mais ne s'agrègent pas entre elles. Nous souhaitons étudier la cinétique d'association entre les particules et les billes. Il faut donc que les particules adhèrent aux billes une par une, et non pas que ce soit des agrégats qui se fixent. De plus nous souhaitons que lorsqu'une particule est retenue à la surface d'une bille, cela empêche la fixation d'une autre particule au même endroit. Car lors de la chromatographie cellulaire la capture spécifique se fait à la surface de la bille seulement. Le tampon utilisé contient de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique, pour fixer le pH), de la BSA (albumine de sérum bovin) et du tween 20 (afin de limiter l'adhésion aux tubes et connecteurs du dispositif expérimental). Au pH auquel nous travaillons, pH=7, les acides carboxyliques de l'alginate sont chargés négativement (les pKa des acides sont inférieurs à 4). Les particules utilisées sont des Dynabeads 1 $\mu$ m recouvertes de streptavidines. Nous avons utilisé des particules fonctionnalisées avec de la streptavidine car les autres types de Dynabeads avaient tendance à s'agréger entre elles. D'après le fournisseur les particules sont fonctionnalisées avec la streptavidine à partir d'acides carboxyliques, de plus le point isoélectrique de la streptavidine est autour de 6, donc à pH=7 les particules sont globalement chargées négativement. Nous avons constaté que l'interaction attractive est favorisée lorsque la concentration en ions calcium augmente ou la concentration en ions sodium diminue. En ajustant la concentration en ions Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup> nous avons déterminé une concentration où les particules adhèrent aux billes d'alginate sans s'agréger. La longueur de Debye est de l'ordre de 1 nm.

L'interaction entre ces deux objets est de nature électrostatique, et dépend de la présence de cations divalents. Considérant la nature de l'interaction, les billes et les particules sont isotropiquement réactives. De plus il n'y a pas de contrainte géométrique sur cette interaction. Et la longueur de Debye nous assure qu'elle intervient à des distances de l'ordre du nanomètre. Nous avons donc un système qui répond à nos critères et qui va nous permettre d'étudier la cinétique de transport.

### 2.1.1.2. Les billes d'alginate

#### Le rayon

L'empilement compact de billes d'alginate doit permettre la circulation de cellules de rayon  $R_C$ . Cette condition est représentée sur le schéma de gauche en Figure 2-1.

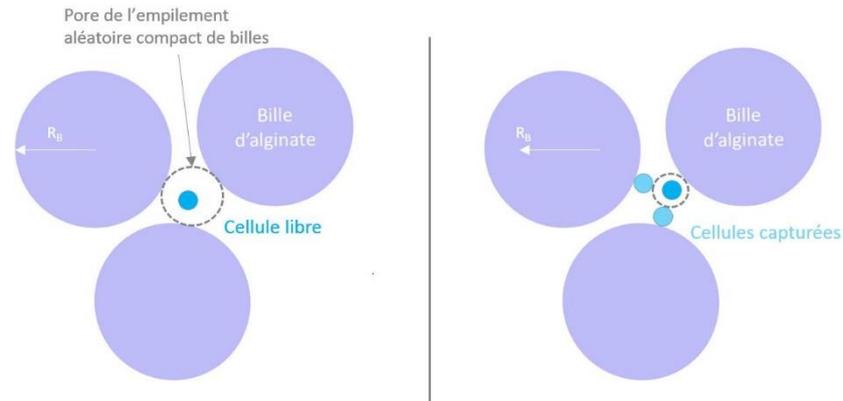


Figure 2-1 : Représentation schématique de l'écoulement d'une suspension cellulaire dans l'empilement de billes d'alginate. La zone délimitée par les pointillés gris est l'espace vide permettant la circulation des cellules. Les cellules peuvent circuler si leur rayon est inférieur au rayon du cercle en pointillés gris. A gauche, le volume libre est seulement contraint par l'empilement de billes. A droite, le volume libre est contraint par l'empilement de billes ainsi que par la présence de cellules capturées à la surface des billes.

La taille des pores dans un empilement compact aléatoire dépend du rayon  $R_B$  des billes le composant. La condition limite décrivant cette contrainte est<sup>2</sup>:

$$R_B > 7 * R_C \quad (2-1)$$

L'équation (2-1) ne prend pas en compte la capture de cellules sur les billes d'alginate. Les pores de l'empilement ne doivent pas laisser passer une mais trois cellules (deux capturées et une en solution) comme cela est représenté sur le schéma de droite de la Figure 2-1. La condition sur le rayon des billes d'alginate est donc :

$$R_B > 7 * 3 * R_C \quad (2-2)$$

L'ordre de grandeur du rayon des cellules humaines est la dizaine de micromètre. Il faut donc que :

$$R_B \geq 210 \mu\text{m} \quad (2-3)$$

Dans les cas des particules qui sont plus petites la condition limite est :

$$R_B \geq 21 \mu\text{m} \quad (2-4)$$

Nous avons donc fabriqué des billes d'alginate de différentes tailles de quelques centaines de micron de rayon.

### Procédé de fabrication des billes d'alginate

La confection de billes se fait à partir d'une solution d'alginate à 1,5 ou 2 % en masse dans de l'eau ultra pure. La solution obtenue est très visqueuse.

Pour obtenir des billes d'une taille contrôlée nous avons utilisé l'Encapsulator. Le procédé de

fabrication des billes est schématisé Figure 2-2. La solution d'alginate, qui se trouve dans une seringue, est mise en mouvement grâce à un pousse-seringue. Afin que le jet d'alginate se fragmente en goutte de taille contrôlée et monodisperse une sollicitation mécanique à une fréquence donnée est appliquée grâce à un actuateur piézoélectrique.

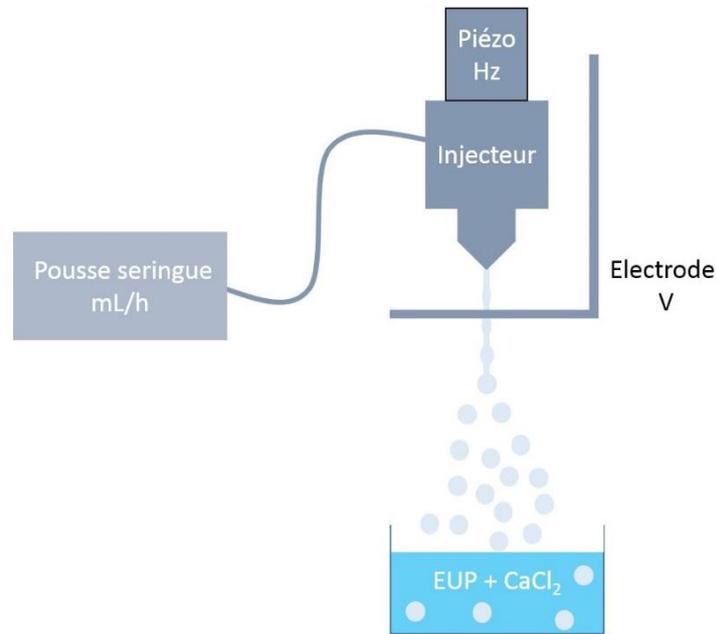


Figure 2-2 : Représentation schématique du système commercial permettant la fabrication de billes d'alginate : Encapsulator. La solution d'alginate, qui se trouve dans la seringue, est mise en mouvement grâce à un pousse-seringue. Afin que le jet d'alginate se fragmente en gouttes de taille contrôlée et monodisperse, une sollicitation mécanique à une fréquence donnée est appliquée grâce à un actuateur piézoélectrique. Les gouttes de solution d'alginate tombent dans une solution de chlorure de calcium (1 mM) où elles gélifient. Pour éviter la coalescence des gouttes (au moment de la chute), une électrode crée une répulsion électrostatique en les chargeant. Les billes restent plusieurs heures dans le bain de calcium, puis elles sont rincées à l'eau ultra pure (EUP).

Les gouttes de solution d'alginate tombent dans une solution de chlorure de calcium (1 mM) où elles gélifient. Pour éviter la coalescence des gouttes (au moment de la chute), une électrode crée une répulsion électrostatique en les chargeant. Les billes restent plusieurs heures dans le bain de calcium, puis elles sont rincées à l'eau ultra pure (EUP).

En jouant sur la fréquence de fragmentation, la taille de l'injecteur et le pourcentage massique d'alginate dans la solution de départ j'ai obtenu des billes d'alginate de différentes tailles dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 2-1.

|                              |     |     |     |     |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Diamètre ( $\mu\text{m}$ )   | 305 | 600 | 722 | 971 |
| Ecart type ( $\mu\text{m}$ ) | 20  | 83  | 88  | 169 |

Tableau 2-1 : Tableau résumant les caractéristiques des billes d'alginate fabriquées

Les billes obtenues ont été observées en microscopie optique. Sur la Figure 2-3 nous constatons que les billes ont une forme sphérique et qu'elles ont une taille définie au sein d'un même lot.

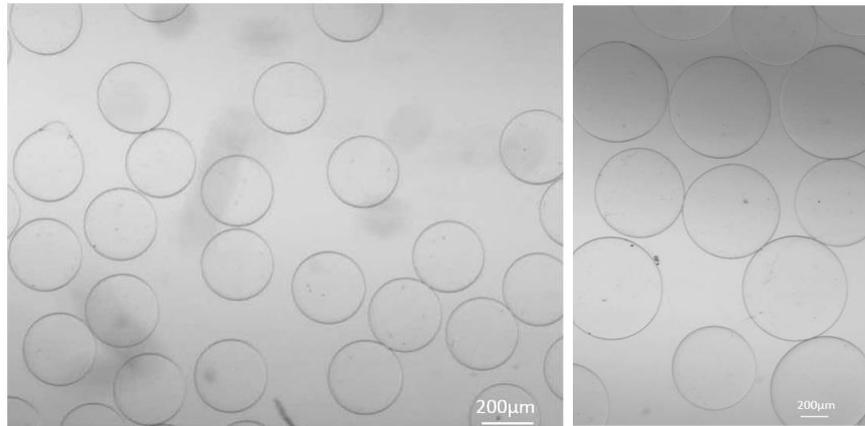


Figure 2-3 : Image de microscopie optique des billes d'alginate de différentes tailles produites avec l'Encapsulator. Les billes sur l'image de gauche ont un diamètre moyen de 305  $\mu\text{m}$ , les billes sur l'image de droite ont un diamètre moyen de 722  $\mu\text{m}$ .

En outre elles sont transparentes et ne dévient pas la lumière ce qui nous permet d'imager directement la capture dans l'empilement de billes d'alginate.

### 2.1.1.3. Les particules magnétiques

#### Caractéristiques des particules

Pour étudier le transport des cellules à proximité de la surface des billes dans une colonne chromatographique nous avons choisi de remplacer les cellules par des particules magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces particules ont une taille et une vitesse de sédimentation du même ordre de grandeur que les cellules dans une solution aqueuse. Le magnétisme des particules ne nous intéresse pas en tant que tel dans notre expérience mais la présence d'oxyde de fer en fait des objets qui absorbent la lumière. Nous allons donc pouvoir suivre leur concentration par des mesures de densité optique (DO).

#### La vitesse

La solution de particules s'écoule dans le capillaire à une vitesse notée  $U$ . Nous souhaitons faire varier cette vitesse afin de voir son influence sur la capture des particules. Il faut au préalable déterminer la gamme de vitesses pertinente à étudier.

En particulier l'écoulement pourrait altérer l'état physiologique des cellules. Le cisaillement dans l'écoulement sanguin peut nous donner un ordre de grandeur de la vitesse maximale. La contrainte de

cisaillement<sup>3</sup> subie par les cellules du sang est de l'ordre de  $1 \text{ N.m}^{-2}$ , ce qui correspond à une vitesse de  $5 \text{ cm.s}^{-1}$  dans un empilement de billes dont la taille des pores est de l'ordre de  $100 \mu\text{m}$ .

La vitesse minimale d'écoulement est fixée par la vitesse de sédimentation des cellules et des particules qui est de l'ordre du micromètre par seconde pour les CSH.

Je vais maintenant présenter le dispositif expérimental permettant de quantifier la capture des particules à la surface des billes d'alginate.

### 2.1.2. Présentation du dispositif expérimental

Durant cette étude expérimentale nous souhaitons étudier un phénomène précis : le transport des particules à proximité de la surface des billes d'alginate. Nous voulons quantifier précisément le taux de collision entre les particules et les billes. Pour cela la capture des particules doit se faire dans un régime où le taux de dissociation est négligeable et la constante d'association n'est pas affectée par le taux d'occupation des particules sur les billes. En effet, au fur et à mesure de la capture la surface des billes est de plus en plus occupée, et cela peut affecter le taux de collision (car il y a moins de sites libres disponibles à la surface des billes par exemple). Cependant dans un premier temps nous ne souhaitons pas mesurer cet effet, nous souhaitons quantifier dans le cas le plus général et le plus simple le transport des particules à la surface des billes.

La méthode classique pour quantifier la rétention de particules (cellules ou colloïdes) dans une colonne chromatographique ou de filtration, est une mesure indirecte. La concentration de la solution de particules est mesurée en amont (typiquement  $5.10^7 \text{ particules.mL}^{-1}$ ) et en aval de la colonne. Pour réaliser un dosage en retour il faut que la quantité de particules capturées soit importante, afin que la différence de concentration entre les solutions en amont et en aval de la colonne soit détectable. Il y a alors deux possibilités :

- La capture des particules est telle que les billes sont peu occupées par les particules. Et dans ce cas nous avons calculé que l'ordre de grandeur du nombre de billes nécessaires pour capturer une quantité suffisante de particules en occupant 10% maximum de la surface des billes n'est pas envisageable à l'échelle du laboratoire.
- La capture des particules est telle qu'en travaillant à une concentration de  $5.10^7 \text{ particules.mL}^{-1}$  la surface des billes est saturée (occupée à plus de 10%) rapidement (trop rapidement pour que nous puissions réaliser notre mesure). Dans ce cas, la concentration en particules doit être diminuée tout en restant détectable afin d'être quantifiée en amont et en aval de la colonne.

Ce moyen de quantification nécessite donc de trouver des conditions très précises de fonctionnement qui peuvent varier pour chaque expérience. De plus avec cette mesure on a accès à la différence de

concentration entre ce qui entre et ce qui sort du dispositif. Cela peut être supérieur à ce qui est capturé dans la colonne si les particules adhèrent aux parois du tube. Et durant les expériences nous avons en effet observé ce phénomène.

Nous avons donc développé un dispositif expérimental inédit afin de quantifier directement et précisément la capture de particules micrométriques en imageant les billes d'alginate. Le principe du dispositif est présenté en Figure 2-4.

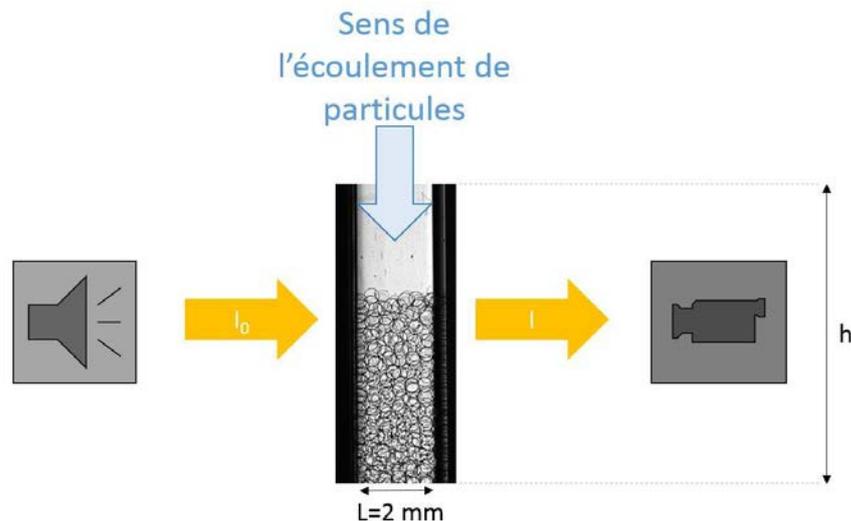


Figure 2-4 : Représentation schématique du dispositif expérimental permettant une quantification directe de la capture des particules par les billes d'alginate. Une solution de particules s'écoule au sein d'un empilement de billes d'alginate contenu dans un capillaire en verre de dimensions  $L \cdot h$ . Une fraction de ces particules est capturée via des interactions électrostatiques par les billes. Ce phénomène est quantifié grâce à une mesure de densité optique.

La capture est quantifiée grâce à une mesure de densité optique réalisée au niveau du capillaire en verre contenant les billes d'alginate.

Les dimensions du capillaire ont donc été choisies afin de quantifier la capture des particules dans un empilement de billes grâce à une mesure de densité optique. Elles ne correspondent absolument pas aux dimensions optimales pour capturer des cellules.

Nous souhaitons étudier la capture de particules dans un empilement aléatoire de billes, formant un milieu poreux. Les dimensions du capillaire  $L$  et  $h$  doivent donc être grandes devant la taille des billes d'alginate dont le rayon  $R_b$  est de l'ordre de la centaine de microns. C'est la seule contrainte sur la dimension  $h$ , nous avons donc fixé :  $h=4$  cm. Par contre la dimension  $L$  du capillaire est limitée par le fait que la quantification de la capture se fait par la mesure de densité optique. D'après la loi de Beer-Lambert, donnée ci-dessous, la DO est proportionnelle à la longueur du trajet optique  $L$  (cf. Figure 2-4) ainsi qu'à la concentration en particules contenues dans le capillaire  $C$ :

$$DO = \varepsilon * L * C \quad (2-5)$$

avec  $\varepsilon$  le coefficient d'absorption ( $m^{-1}.M^{-1}$ ). Cette loi est vérifiée sur une certaine gamme de concentrations pour une longueur de trajet optique donnée. Au-dessus d'une concentration  $C_+$  le signal de DO sature, et en dessous d'une concentration  $C_-$  le signal de DO est nul. La longueur L doit être choisie de sorte que le signal de DO soit proportionnel à la concentration en particules dans la gamme qui nous intéresse, c'est-à-dire autour de  $10^7$  particules.mL<sup>-1</sup>. Nous avons pris L=2 mm.

Le montage fluide se compose d'un capillaire en verre carré de section 2 x 2 mm et de longueur 4 cm. Des tubulures de part et d'autre permettent d'acheminer et d'éliminer la solution de particules comme cela est montré en Figure 2-5.

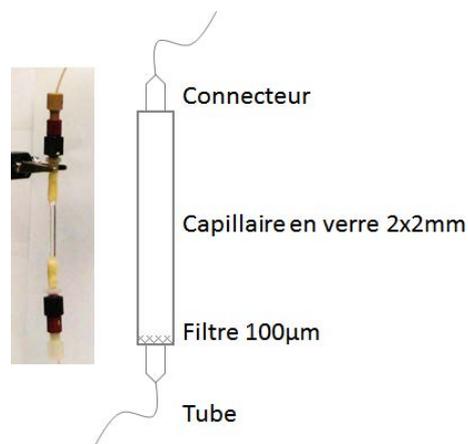


Figure 2-5 : Photographie et schéma représentant le capillaire contenant l'empilement de billes d'alginate pour les expériences de capture

Initialement le montage est rempli avec du tampon. Une pompe péristaltique permet de faire transiter la solution de particules dans le capillaire. La Figure 2-6 montre le dispositif expérimental dans son ensemble.

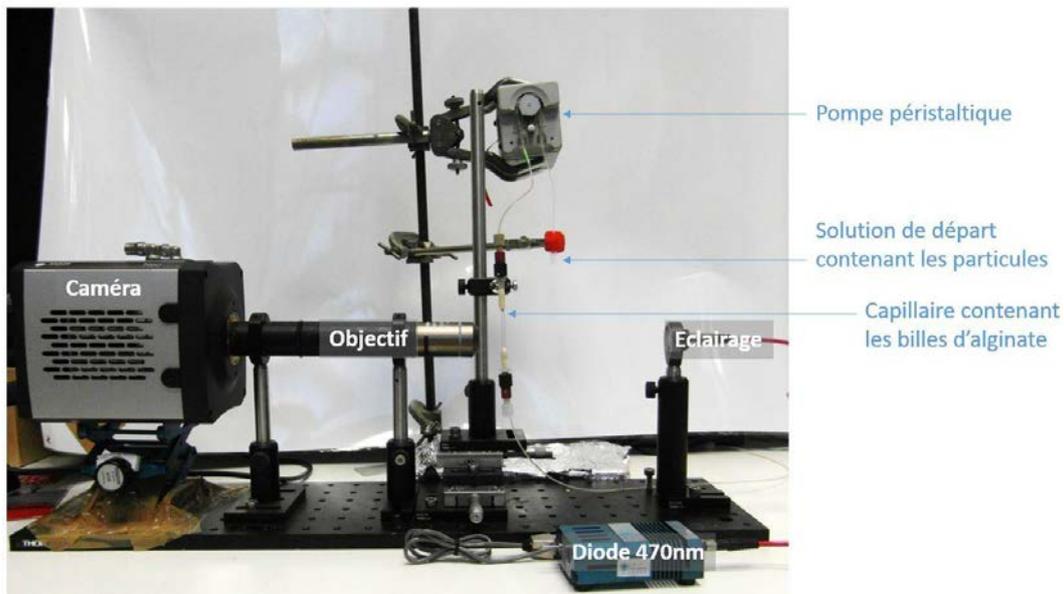


Figure 2-6 : Photographie du dispositif expérimental permettant la quantification de la capture des particules sur les billes d'alginate. La solution de départ contenant des particules transite dans la colonne contenant les billes d'alginate grâce à une pompe péristaltique. La quantification de la capture se fait par une mesure densité optique en imageant les billes contenues dans la colonne. Les billes sont éclairées à 470nm par une diode. Grâce à un objectif et à une caméra une image de l'empilement de billes est prise toutes les minutes. Une expérience typique de capture dure 60 minutes.

Pendant le passage de la solution de particules, l'empilement de billes d'alginate contenu dans le capillaire est imagé régulièrement. Le montage optique est le suivant (cf. Figure 2-6): le capillaire est éclairé par une diode éclairant à 470 nm. Grâce à un objectif de grossissement 2 et à une lentille convergente les billes dans le capillaire sont imagées avec une caméra. Les images nous donnent accès à l'intensité lumineuse transmise (en niveau de gris) et nous pouvons donc réaliser des mesures de DO comme nous allons le voir plus en détails dans la suite.

L'image est réalisée au niveau du haut de l'empilement (cf. Figure 2-7) de manière à imagier aussi une zone sans bille. Ceci nous permet de connaître la concentration en particules libres dans la solution.

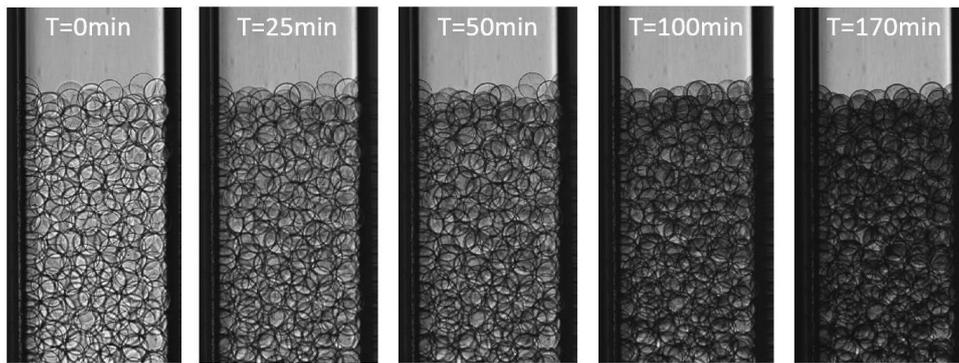


Figure 2-7 : Images de microscopie optique du capillaire contenant des billes d'alginate de 305  $\mu\text{m}$  de diamètre durant une expérience de capture de particules micrométriques en fonction du temps T. Au cours du temps les billes deviennent de plus en plus foncées, ce qui correspond à la capture des particules. L'intensité transmise au niveau des billes nous permet de quantifier la capture. L'intensité transmise en amont des billes nous permet de connaître la concentration en particules libres.

Au cours du temps les billes deviennent de plus en plus foncées comme nous pouvons le voir en Figure 2-7, ce qui correspond à la capture des particules.

Une fois passée dans le capillaire, la solution de particules est envoyée vers une poubelle comme cela est représenté dans la Figure 2-8.

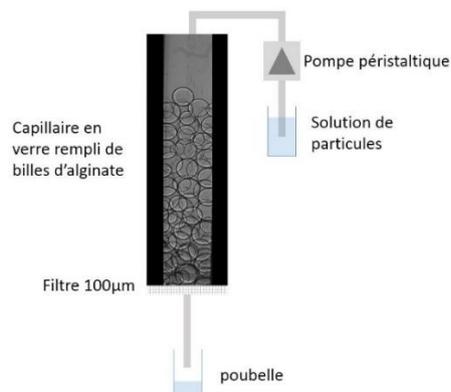


Figure 2-8 : Représentation schématique du dispositif expérimental. La solution de particules s'écoule dans le capillaire contenant les billes d'alginate grâce à une pompe péristaltique. La solution de particules en sortie du capillaire est récupérée dans une poubelle.

Nous allons maintenant détailler comment déduire la quantité de particules capturées à partir de ces images.

### 2.1.3. Quantification de la capture

La quantification de la capture se fait par une mesure de densité optique qui repose sur la quantité de lumière absorbée par les particules magnétiques. Cette mesure permet de déterminer la concentration en particules. La densité optique en un point est le rapport de l'intensité transmise  $I$  par l'intensité reçue  $I_0$ , comme cela est représenté en Figure 2-9.

$$DO(z) = \log\left(\frac{I_0(z)}{I(z)}\right) \quad (2-6)$$

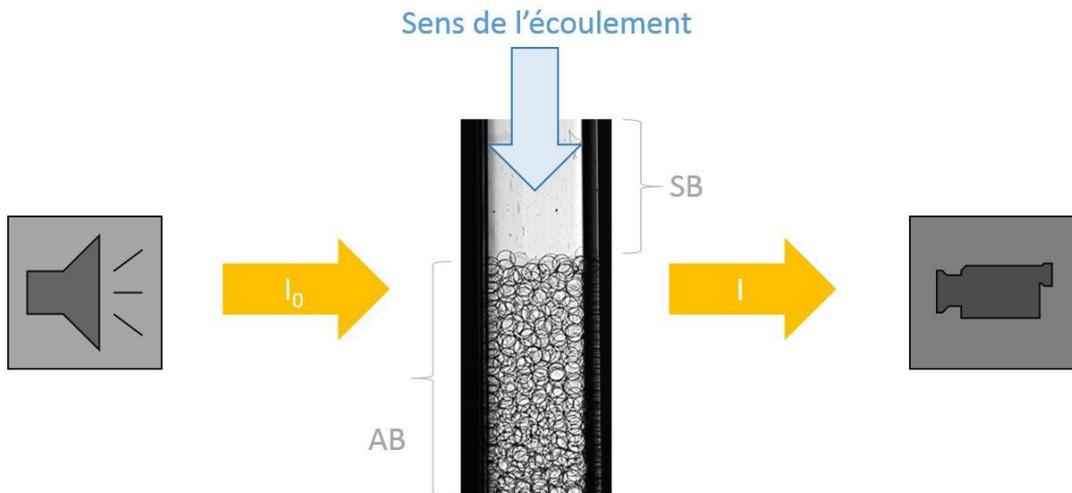


Figure 2-9 : Schéma explicatif de la mesure de densité optique au niveau du capillaire contenant les billes d'alginate. Le capillaire est éclairé à 470nm par une diode. L'intensité lumineuse correspondante est  $I_0$ . En imageant l'empilement de billes nous avons accès à l'intensité transmise  $I$ . Afin de quantifier la capture des particules par les billes d'alginate, il faut mesurer l'intensité transmise au niveau de la zone sans bille d'alginate (SB) et au niveau de la zone avec les billes (AB).

Afin de quantifier la capture des particules par les billes nous devons déterminer la concentration en particules en amont des billes d'alginate et au niveau des billes d'alginate. Nous voulons donc calculer la densité optique dans le capillaire dans la zone sans bille (SB) et dans la zone avec billes d'alginate (AB) comme nous le voyons en Figure 2-9. Pour chaque expérience nous disposons d'une série d'images prises toutes les minutes (cf. Figure 2-7). Sur chaque image les intensités à l'extérieur du tube  $I_E$ , en amont des billes  $I_{SB}$  et au niveau des billes  $I_{AB}$  sont mesurées comme cela est représenté en Figure 2-10. L'intensité lumineuse est proportionnelle au niveau de gris sur l'image.

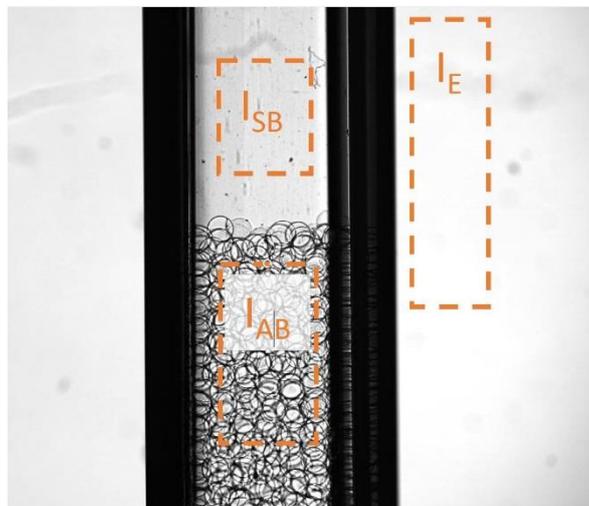


Figure 2-10 : Schéma indiquant les trois zones où l'intensité lumineuse est mesurée : au niveau des billes d'alginate  $I_{AB}$ , dans le capillaire dans la zone sans bille  $I_{SB}$ , et à l'extérieur du capillaire  $I_E$ .

Dans un premier temps nous devons déterminer l'intensité reçue par les particules au niveau des billes d'alginate  $I_{0AB}$ , et de la solution en amont des billes  $I_{0SB}$ . Pour cela nous mesurons l'intensité transmise lorsque le dispositif est rempli avec le tampon sans particule. Cette intensité est inférieure à l'intensité à l'extérieur du capillaire  $I_E$  car le capillaire en verre, le tampon et les billes absorbent une partie de l'intensité reçue. Si l'éclairage est constant les intensités reçues  $I_{0SB}(t)$  et  $I_{0AB}(t)$  sont égales aux intensités transmises lorsque le capillaire est rempli de tampon au début de l'expérience,  $I_{SB}(t = 0)$  et  $I_{AB}(t = 0)$ . Cependant l'éclairage varie au cours du temps. Pour estimer l'intensité reçue dans le capillaire nous utilisons l'intensité mesurée à l'extérieur du capillaire  $I_E$ . Nous faisons l'hypothèse qu'au cours du temps la répartition spatiale de l'intensité ne varie pas, nous pouvons donc écrire la relation suivante :

$$\frac{I_{0SB}(t)}{I_E(t)} = \alpha \text{ et } \frac{I_{0AB}(t)}{I_E(t)} = \beta \quad (2-7)$$

Les constantes  $\alpha$  et  $\beta$  sont déterminées à  $t=0$ . En mesurant l'intensité à l'extérieur du capillaire au cours du temps, nous en déduisons les intensités reçues  $I_{0SB}(t)$  et  $I_{0AB}(t)$ . La densité optique en amont des billes et dans les billes est alors calculée de la manière suivante :

$$DO_{SB}(t) = \log\left(\frac{\alpha * I_E(t) - I_{\text{noir}}}{I_{SB}(t) - I_{\text{noir}}}\right) \text{ et } DO_{AB}(t) = \log\left(\frac{\beta * I_E(t) - I_{\text{noir}}}{I_{AB}(t) - I_{\text{noir}}}\right) \quad (2-8)$$

avec  $I_{\text{noir}}$  le niveau de gris lorsque la source lumineuse est éteinte.

La loi de Beer-Lambert (2-6) relie la densité optique d'une solution de particules à la concentration en particules via le coefficient d'extinction  $\varepsilon$ . Nous avons déterminé le coefficient  $\varepsilon$  des particules que nous utilisons grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec notre dispositif expérimentale sans bille d'alginate. La Figure 2-11 représente la densité optique pour un trajet optique de 1 cm en fonction de la concentration en particules. Les points représentent les données expérimentales. La courbe en pointillés et l'équation correspondante sont issues d'une régression linéaire.

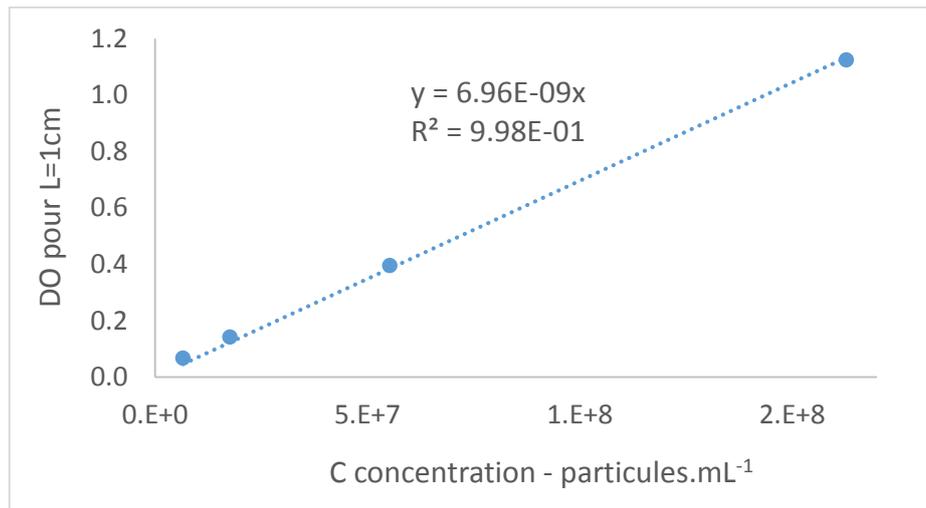


Figure 2-11 : Courbe d'étalonnage reliant la densité optique mesurée avec le dispositif expérimental et la concentration en particules pour un trajet optique de 1 cm. Cette courbe nous permet de déterminer le coefficient d'extinction des particules.

Nous en déduisons que  $\varepsilon = 6,96 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2 \cdot \text{particule}^{-1}$ . Le coefficient d'absorption est intrinsèque aux particules. Il dépend de leur indice et de leur taille. Nous pouvons donc utiliser le coefficient  $\varepsilon$  que nous avons déterminé pour déduire la concentration en particules aussi bien dans la zone sans bille d'alginate que dans la zone contenant les billes d'alginate.

La mesure de DO dans la zone SB nous donne donc accès à la concentration en particules libres en amont des billes  $C_{PL0}$  (cf. Figure 2-12). La mesure de DO au niveau des billes d'alginate est proportionnelle à la concentration totale en particules  $C_{PT}$  c'est-à-dire aux particules capturées à la surface des billes, et aux particules libres dans l'écoulement :

$$DO_{AB}(z, t) = \varepsilon * L * (1 - \phi) * C_{PT}(z, t) = \varepsilon * L * (1 - \phi) * [C_{PL}(z, t) + C_{PC}(z, t)] \quad (2-9)$$

avec  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction des particules,  $L$  la longueur du trajet optique (2 mm),  $\phi$  la fraction volumique en billes d'alginate,  $C_{PL}$  la concentration en particules libres dans la solution, et  $C_{PC}$  la concentration en particules retenues à la surface des billes d'alginate, que nous appellerons par la suite « particules capturées ». Les différentes grandeurs sont représentées sur la Figure 2-12.

### Sens d'écoulement des particules

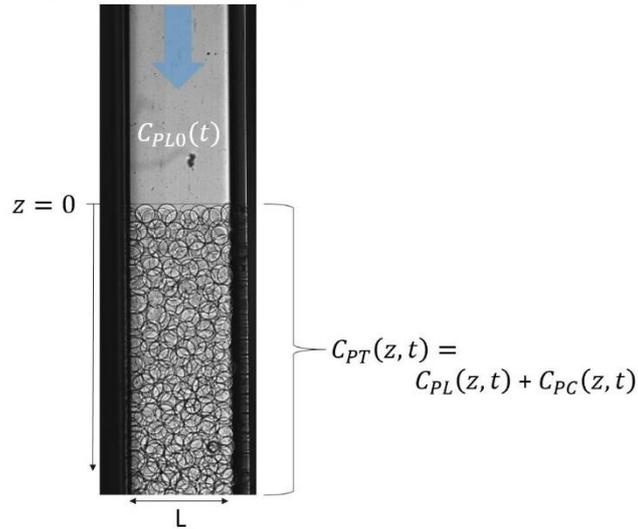


Figure 2-12 : Schéma explicatif représentant les différentes concentrations en jeu dans la mesure de densité optique au niveau du capillaire.  $C_{PL0}$  est la concentration en particules en amont des billes,  $C_{PL}$  est la concentration en particules libres dans l'empilement de billes,  $C_{PC}$  est la concentration en particules capturées à la surface des billes et  $C_{PT}$  est la somme de  $C_{PC}$  et  $C_{PL}$ , c'est-à-dire la concentration totale en particules.

Il est important de noter que toutes les concentrations correspondent au nombre de particules par unité de volume sans bille d'alginate, c'est-à-dire que pour un volume  $V$  de l'empilement de billes :

$$C_{PT} = \frac{\text{Nombre de particules libres et capturées contenues dans un volume } V \text{ de l'empilement}}{V \cdot (1 - \phi)} \quad (2-10)$$

$$C_{PL} = \frac{\text{Nombre de particules libres contenues dans un volume } V \text{ de l'empilement}}{V \cdot (1 - \phi)} \quad (2-11)$$

$$C_{PC} = \frac{\text{Nombre de particules capturées contenues dans un volume } V \text{ de l'empilement}}{V \cdot (1 - \phi)} \quad (2-12)$$

Le trajet optique n'est donc pas  $L$ , mais  $L \cdot (1 - \phi)$ , car il n'y a pas de particule dans les billes d'alginate mais seulement dans les pores de l'empilement.

La détermination des concentrations en particules nécessite de connaître la fraction volumique en billes  $\phi$ . Les tailles des billes d'alginate sont du même ordre de grandeur que la taille du capillaire en verre. Donc la fraction volumique en bille  $\phi$  dans l'empilement n'est pas celle d'un empilement compact idéal  $\phi = 0,64$ . La fraction volumique des billes dépend du rapport du diamètre des billes sur la longueur du côté du capillaire :  $\frac{R_B}{L}$  avec  $L = 2 \text{ mm}$ . Un article de R. Ben Aïm et P. Le Goff en 1967<sup>4</sup>, nous permet d'estimer la porosité  $\varepsilon$  dans un empilement compact de sphères de rayon  $R_B$  contenues dans un récipient cylindrique de rayon  $R$  :

$$\varepsilon = \frac{A - 1 + \varepsilon_0}{A} \quad (2-13)$$

$$\text{avec } A = 1 + 0,6 \cdot \frac{R_B}{R} \text{ et } \varepsilon_0 = 0,36 \quad (2-14)$$

Cette formule décrit bien les résultats expérimentaux jusqu'à  $\frac{R_B}{R} = 0,3$ . Nous ne sommes pas dans le cas d'un récipient cylindrique mais cette formule nous permet d'avoir un ordre de grandeur de la fraction volumique. Nous utilisons cette formule pour les 3 plus petits diamètres. Pour le plus grand diamètre, nous nous trouvons dans le cas où  $\frac{R_B}{R} = 0,5$ , cas traité par Carman en 1937<sup>5</sup>. Le Tableau 2-2 résume les valeurs de fractions volumiques en fonction du diamètre des billes d'alginate.

| Diamètre des billes en $\mu\text{m}$ | Fraction volumique $\phi$ de l'empilement de billes dans un capillaire de section 2x2 mm |
|--------------------------------------|--|
| 305                                  | 0.59   |
| 600                                  | 0.54   |
| 722                                  | 0.53   |
| 971                                  | 0.47   |

Tableau 2-2 : Tableau récapitulatif de la porosité d'un empilement compact aléatoire de billes d'alginate dans un capillaire de dimension 2x2x40 mm. Selon le rapport du diamètre des billes et de la taille du capillaire, la porosité est déterminée d'après l'article de R. Ben Aïm et P. Le Goff<sup>4</sup> ou Carman<sup>5</sup>.

Je vais maintenant présenter les résultats obtenus avec ce dispositif, et comment nous pouvons en déduire la constante cinétique d'association  $k_{on}$ .

## 2.1.4. Résultats

### 2.1.4.1. Mesure de la capture en fonction du temps et détermination de la constante cinétique d'association $k_{on}$

Dans un premier temps nous allons caractériser la cinétique de capture en fonction des deux paramètres de base : le temps et la concentration en particules libres. Cela va nous permettre de déduire la constante cinétique d'association  $k_{on}$  à partir des données expérimentales. Nous allons détailler le raisonnement dans le cas d'un exemple mais il s'applique à toutes les expériences présentées par la suite.

#### Données expérimentales brutes

L'expérience que nous étudions a été réalisée avec des billes d'alginate de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre. La vitesse moyenne des particules dans le capillaire est 8  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nous représentons sur la Figure 2-13 en bleu la concentration totale en particules  $C_{pT}(t)$  déterminée à partir de l'équation (2-9), et en orange la concentration en particules libres dans la solution mesurée en amont des billes d'alginate  $C_{pL0}(t)$ .

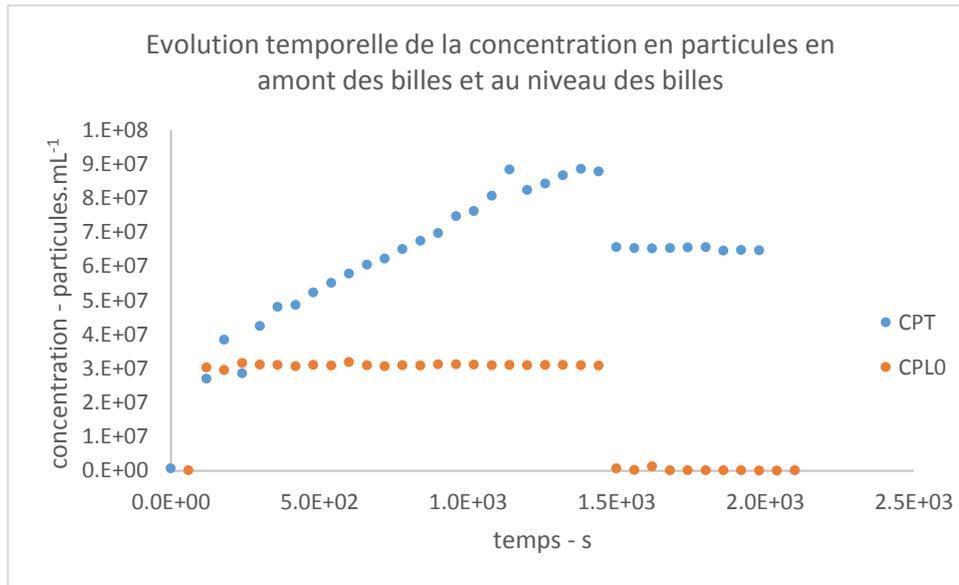


Figure 2-13 : Mesures effectuées durant une expérience de capture. La concentration totale en particules dans l'empilement de billes d'alginate est représentée en orange. La concentration en particules libres en amont de l'empilement est représentée en orange. Les billes d'alginate ont un diamètre de 600  $\mu\text{m}$ , et la vitesse de l'écoulement est de 7,8  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Au début de l'expérience le tampon est remplacé par la solution contenant les particules, la concentration en amont des billes augmente donc de 0 à  $3.10^7$  particules. $\text{mL}^{-1}$  (courbe orange). Ensuite la concentration est constante jusqu'à 1500 secondes, puis la colonne est rincée (à la même vitesse que pendant le passage des particules) avec du tampon et la concentration en particules libres est à nouveau nulle.

La courbe bleue représente la concentration totale en particules au cours du temps. L'évolution de cette concentration avec le temps est linéaire tant que la concentration en particules dans le surnageant est constante. Nous souhaitons déterminer à partir de ces données expérimentales, la constante cinétique d'association  $k_{on}$ .

### Equations décrivant les données expérimentales

Afin de déterminer  $k_{on}$  à partir des données représentées en Figure 2-13 nous allons écrire les équations décrivant l'évolution temporelle de la concentration totale en particules  $C_{PT}$ , en particules libres  $C_{PL}$  et en particules capturées  $C_{PC}$  en fonction du temps en un point  $z$  de l'empilement des billes (vu la géométrie du problème nous faisons l'hypothèse que les concentrations ne dépendent que de la coordonnée  $z$ ). La conservation de la masse appliquée à la concentration totale en particules, c'est à dire capturées et libres,  $C_{PT}$ , nous donne l'équation suivante:

$$\frac{\partial C_{PT}(t,z)}{\partial t} = -U_P * \frac{\partial C_{PT}(t,z)}{\partial z} - k_{on} * C_{PL}(t,z) + k_{off} * C_{PC}(t,z) \quad (2-15)$$

Dans le membre de droite, le premier terme correspond à la convection (l'apport de particules par l'écoulement à la vitesse  $U_p$ ), le second terme correspond à la capture des particules libres à la surface des billes d'alginate, et le dernier terme représente le détachement des particules capturées. La vitesse moyenne dans les pores est égale à la vitesse moyenne dans le capillaire  $U$  divisée par la porosité de l'empilement  $(1-\phi)^6$  :

$$U_p = \frac{U}{(1-\phi)} \quad (2-16)$$

Nous faisons ici l'hypothèse que la constante d'association est indépendante de la concentration en sites libres sur les billes d'alginate. En effet lorsqu'une particule est retenue à la surface d'une bille elle occupe un site qui n'est plus disponible pour les particules libres suivantes. Cette hypothèse est vérifiée tant que la surface occupée par les particules capturées est négligeable par rapport à la surface libre de bille. De plus nous nous plaçons dans le cas stationnaire pour la concentration en particules libres  $\frac{\partial C_{PL}(t,z)}{\partial t} = 0$ , l'équation (2-15) s'écrit alors :

$$\frac{dC_{PL}(z)}{dz} = -\frac{k_{on}}{U_p} * C_{PL}(z) + \frac{k_{off}}{U_p} * C_{PC}(t, z) \quad (2-17)$$

La concentration en particules libres  $C_{PL}$  est régie par la cinétique d'association et de dissociation entre les particules et les billes d'alginate. Dans le cas où le taux de dissociation est négligeable devant le taux d'association :

$$k_{on} * C_{PL}(z) \gg k_{off} * C_{PC}(t, z) \quad (2-18)$$

Nous obtenons l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC_{PL}(z)}{dz} = -\frac{k_{on}}{U_p} * C_{PL}(z) \quad (2-19)$$

Nous en déduisons la concentration en particules libres  $C_{PL}$  en fonction de la position dans la colonne selon  $z$  :

$$C_{PL}(z) = C_{PL0} * \exp\left(-\frac{k_{on}}{U_p} * z\right) \quad (2-20)$$

La capture des particules par les billes d'alginate entraîne une décroissance exponentielle selon  $z$  de la concentration en particules libres dans la colonne.

Nous allons maintenant exprimer la concentration en particules capturées  $C_{PC}(t, z)$  toujours dans le cas où le taux de dissociation est négligeable devant le taux d'association, et que la concentration en particules libres est en régime stationnaire. Par définition de la constante cinétique d'association nous écrivons l'équation suivante :

$$\frac{\partial C_{PC}(t,z)}{\partial t} = k_{on} * C_{PL}(z) \quad (2-21)$$

La concentration en particules capturées s'exprime alors selon l'équation ci-dessous :

$$C_{PC}(t, z) = k_{on} * C_{PL}(z) * t \quad (2-22)$$

Ou encore :

$$C_{PC}(t, z) = k_{on} * C_{PL0} * \exp\left(-\frac{k_{on}}{U_P} * z\right) * t \quad (2-23)$$

Expérimentalement nous ne mesurons pas l'évolution temporelle de la concentration en particules capturées  $C_{PC}$  mais celle de la concentration totale en particules  $C_{PT}$  (cf. équation (2-9)). Mais nous nous sommes placés dans le cas où la concentration en particules libres  $C_{PL}$  est en régime stationnaire, donc :

$$\frac{\partial C_{PT}(t, z)}{\partial t} = \frac{\partial C_{PC}(t, z)}{\partial t} \quad (2-24)$$

La mesure de l'intensité lumineuse au niveau des billes d'alginate qui permet de connaître  $C_{PT}$ , est mesurée sur plusieurs billes en même temps. Cela permet de moyennner les variations dues à des paramètres qui ne nous intéressent pas mais dont nous ne pouvons pas nous affranchir tels que la polydispersité des billes ou bien l'organisation de l'empilement. De plus dans l'équation (2-9), la longueur du trajet optique est  $L * (1 - \phi)$ , avec  $\phi$  la fraction volumique en bille. Lorsque le diamètre des billes est petit devant  $L$ , la mesure peut se faire sur une zone de taille inférieure à une bille. Par contre lorsque le diamètre des billes est comparable à la taille du capillaire, il faut moyennner la mesure de DO sur plusieurs billes afin que le trajet optique moyen soit  $L * (1 - \phi)$ . Sur la Figure 2-14 les pointillés jaunes représentent la zone où la mesure de l'intensité  $I_{AB}(t)$  est effectuée.

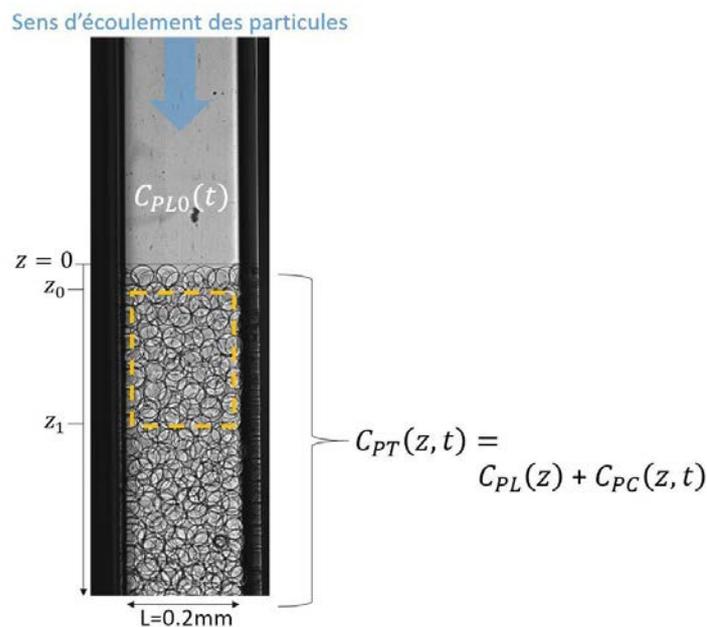


Figure 2-14 : Schéma explicatif concernant l'analyse des données expérimentales. Les pointillés jaunes définissent la zone où  $I_{AB}(t)$  est mesurée.

La mesure que nous effectuons n'est pas en un point  $z$ . Afin de déterminer  $k_{on}$  il faut donc intégrer le signal selon  $z$ . Nous pouvons aussi faire l'hypothèse que la cinétique de capture est faible comparée à l'apport de particules par l'écoulement à la vitesse  $U_p$ , qui est la vitesse d'écoulement dans les pores de l'empilement de billes. Cette hypothèse est justifiée tant que la mesure est effectuée en dessous de la longueur caractéristique  $l_c = \frac{U_p}{k_{on}}$ . La dernière hypothèse que nous faisons lors de l'analyse des données est donc :

$$z_1 \ll l_c \quad (2-25)$$

Cela implique pour la concentration en particules libres  $C_{PL}$  :

$$C_{PL}(z < z_1) = C_{PL0} \quad (2-26)$$

Dans ce cas l'équation (2-21) se simplifie de la manière suivante :

$$C_{PC}(t, z < z_1) = k_{on} * C_{PL0} * t \quad (2-27)$$

Finalement l'équation (2-22) et l'équation (2-25) nous permettent de relier directement la dérivée temporelle de la concentration totale en particules et la constante d'association :

$$\frac{\partial C_{PT}(t,z)}{\partial t} = k_{on} * C_{PL0} \quad (2-28)$$

Nous avons conçu le dispositif expérimental afin que les différentes hypothèses faites pour calculer la constante d'association  $k_{on}$  soient vérifiées.

### Détermination de la constante d'association à partir des données expérimentales

Expérimentalement nous mesurons au cours du temps la densité optique au niveau des billes d'alginate qui est proportionnelle à la concentration totale en particules  $C_{PT}$  (cf. Figure 2-13, courbe bleue). Nous pouvons donc en déduire la valeur expérimentale de la dérivée temporelle de  $C_{PT}$ , notée  $\tau$ , qui d'après l'équation (2-28) s'exprime de la manière suivante :

$$\tau(z) = k_{on} * C_{PL0} \quad (2-29)$$

Grâce à la mesure de densité optique dans la zone SB en amont des billes (courbe orange de la Figure 2-13) nous connaissons la concentration  $C_{PL0}$ . Nous pouvons donc déterminer expérimentalement  $k_{on}$  d'après l'équation (2-29).

A partir des données sur la Figure 2-13, on détermine que  $C_{PL0} = 3.10^7$  particules.mL<sup>-1</sup> et  $\tau = 4,6.10^4$  particules.mL<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Expérimentalement la constante d'association  $k_{on}$  vaut  $1,5.10^{-3}$  s<sup>-1</sup>.

## Vérifications des hypothèses

Nous pouvons vérifier à posteriori les hypothèses que nous avons faites pour déterminer  $k_{on}$  expérimentalement.

La première hypothèse concerne le taux d'occupation des particules sur les billes d'alginate. La concentration en particules capturées,  $C_{PC}$ , à la fin de l'expérience est  $6,6 \cdot 10^7$  particules.mL<sup>-1</sup>. Cette concentration correspond au nombre de particules capturées par unité de volume libre (cf. équation (2-12)). Donc le nombre de particules capturées par unité de volume de colonne est  $C_{PC} * (1 - \phi)$  avec  $\phi$  la fraction volumique en bille. La surface de particules capturées  $S_p$  par unité de volume de colonne est donc égale à :

$$S_p = C_{PC} * (1 - \phi) * \pi * R_p^2 \quad (2-30)$$

A la fin de l'expérience  $S_p$  est de  $2,4 \cdot 10^{-1}$  cm<sup>2</sup>.mL<sup>-1</sup>. La surface de bille disponible par unité de volume de colonne est donnée par la formule suivante :

$$S_B = \frac{\phi}{\frac{4}{3} * \pi * R_B^3} * 4 * \pi * R_B^2 \quad (2-31)$$

Pour des billes de 600  $\mu$ m de diamètre  $S_B=54$  cm<sup>2</sup>.mL<sup>-1</sup>. Nous trouvons finalement que la surface de billes occupée par des particules est inférieure à 1% de la surface totale de billes. La surface occupée est donc bien négligeable par rapport à la surface libre.

La seconde hypothèse concerne le taux de dissociation. Lorsque la colonne est rincée avec du tampon ne contenant pas les particules, l'équation différentielle décrivant l'évolution de la concentration en particules capturées avec le temps est :

$$\frac{\partial C_{PC}(t,z)}{\partial t} = -k_{off} * C_{PC}(t,z) \quad (2-32)$$

Donc :

$$C_{PC}(z,t) = C_{PC0}(z) * \exp(-k_{off} * t) \quad (2-33)$$

Avec  $C_{PC0}(z)$  la concentration en particules capturées au début de la phase de rinçage. En ajustant une courbe de type  $A * \exp(-B * t)$  aux données expérimentales pendant la phase de rinçage nous trouvons que :  $k_{off}=3 \cdot 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>. Le taux de dissociation est donc de  $1,9 \cdot 10^3$  particules.mL<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Ce qui représente 4% du taux d'association ( $4,6 \cdot 10^4$  particules.mL<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). Le taux de dissociation est donc bien négligeable par rapport au taux d'association.

La dernière hypothèse que nous allons vérifier concerne la concentration en particules libres dans la zone où la mesure de  $I_{AB}$  est réalisée (cf. Figure 2-14). Dans l'expérience représentée en Figure 2-13  $z_1=0,2$  cm,  $k_{on}=1,5 \cdot 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>,  $U_p=1,7$  cm.s<sup>-1</sup>. La longueur caractéristique est  $1,1 \cdot 10^3$  cm, elle est donc

grande devant  $z_1$ . Nous pouvons alors faire l'hypothèse que la capture de particules est négligeable par rapport à leur apport par convection. La concentration en particules libres dans la zone où la mesure est effectuée peut donc être estimée par  $C_{PL0}$ .

Pour chaque expérience présentée dans la suite le même raisonnement, que celui présenté ci-dessus, a permis de déterminer la valeur de la constante cinétique d'association. Dans la suite nous n'allons pas détailler la détermination de  $k_{on}$  pour chaque expérience, mais pour plus de détails voir l'Annexe A. Afin d'estimer la précision de cette méthode de mesure nous avons réalisé trois fois la même expérience. Les résultats sont présentés en Annexe A.

Nous allons maintenant nous intéresser à la cinétique d'association en fonction de la vitesse de l'écoulement et de la taille des billes d'alginate.

### 2.1.4.2. Cinétique d'association en fonction de la vitesse

Pour étudier l'influence de la vitesse de l'écoulement sur la constante d'association  $k_{on}$  nous avons réalisé des expériences avec des billes d'alginate de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre et une concentration en particules libres  $C_{PL0}$  comprise entre  $2 \cdot 10^7$  et  $3 \cdot 10^7$  particules. $\text{mL}^{-1}$ . La vitesse de l'écoulement dans le capillaire  $U$  varie de  $0,07 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Le Tableau 2-3 résume les valeurs expérimentales de  $k_{on}$  en fonction de la vitesse de l'écoulement dans le capillaire.

|   |                     |                     |                     |                     |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Vitesse de l'écoulement<br>$U \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ | 8                   | 2                   | 0,3                 | 0,07                |
| Constante d'association<br>$k_{on} \text{ s}^{-1}$          | $1,5 \cdot 10^{-3}$ | $3,5 \cdot 10^{-3}$ | $1,1 \cdot 10^{-3}$ | $1,3 \cdot 10^{-3}$ |

Tableau 2-3 : Constantes cinétiques d'association expérimentales. Les expériences ont été réalisées à différentes vitesses d'écoulement avec des billes d'alginate de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre.

La constante d'association a le même ordre de grandeur quelle que soit la vitesse d'écoulement entre  $7 \cdot 10^{-2}$  et  $8 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Lorsque la vitesse de l'écoulement augmente le nombre de particules traversant une section, ou amenées par l'écoulement au niveau des billes, par unité de temps augmente aussi. Or ce qui nous intéresse dans une réaction c'est sa cinétique mais aussi son rendement. Afin de déterminer le rendement de la capture il faut comparer le nombre de particules capturées dans un volume  $V$  pendant un temps  $T$  et le nombre de particules qui ont traversé ce volume pendant une durée  $T$ . Nous considérons le volume  $V$  délimité par les pointillés jaunes sur la Figure 2-14. Le nombre de particules capturées  $N_{\text{capt}}$  dans le volume  $V$  de colonne est :

$$N_{\text{capt}} = k_{on} * C_{PL0} * S * (z_1 - z_0) * T * (1 - \phi) \quad (2-34)$$

avec  $S$  la section de la colonne. Le nombre de particules entrées  $N_0$  dans le volume  $V$  est :

$$N_0 = C_{PL0} * S * U * T \quad (2-35)$$

Le rendement  $r$  de la capture est donc :

$$r = \frac{N_{capt}}{N_0} = k_{on} * \frac{z_1 - z_0}{U_P} \quad (2-36)$$

Le rendement de la capture est donc caractérisé par le rapport de la constante cinétique d'association sur la vitesse de l'écoulement dans les pores :  $\frac{k_{on}}{U_P}$ . Cette grandeur représente le rendement par unité de longueur de la colonne. La Figure 2-15 représente  $\frac{k_{on}}{U_P}$  en fonction de la vitesse de l'écoulement  $U_P$ .

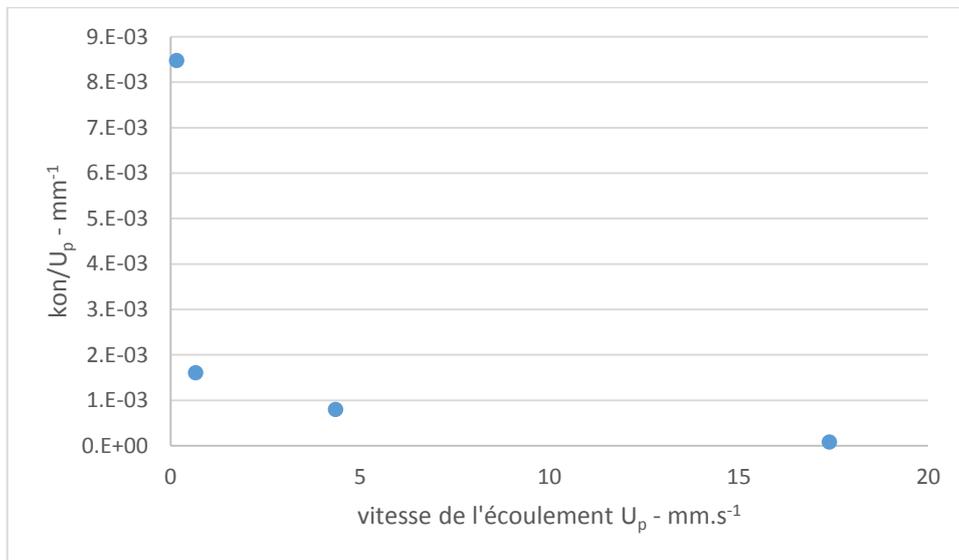


Figure 2-15 : Courbe représentant le rendement par unité de longueur de colonne  $\frac{k_{on}}{U_P}$  en  $mm^{-1}$  en fonction de la vitesse de l'écoulement dans les pores  $U_P$ .

Nous constatons que le rendement de capture  $\frac{k_{on}}{U_P}$  diminue de manière importante avec la vitesse de l'écoulement. Le phénomène d'association est donc moins efficace lorsque la vitesse augmente. Cela signifie par exemple qu'en multipliant la vitesse par deux, deux fois plus de particules traversent la colonne dans un temps donné, mais les billes ne capturent pas deux fois plus de particules. Proportionnellement elles en capturent moins de deux fois plus. Le rendement de capture diminue donc lorsque la vitesse augmente.

Ces expériences nous montrent que la cinétique et le rendement de la capture sont très dépendants de la vitesse de l'écoulement. Lorsqu'on augmente la vitesse la cinétique d'association augmente car plus de particules sont amenées par unité de temps dans la colonne. Mais dans le même temps le rendement de la capture diminue. Nous interpréterons ces effets dans la partie suivante. Nous allons

maintenant nous intéresser à l'effet de la taille des billes d'alginate sur la constante cinétique d'association.

### 2.1.4.3. Cinétique d'association en fonction de la taille des billes

La taille des billes d'alginate est un paramètre sur lequel nous pouvons jouer. De prime abord la taille des billes influence la surface de capture disponible pour un volume de colonne donné. Pour maximiser cette surface il faut utiliser les billes les plus petites possibles. Dans le même temps l'empilement de billes doit laisser circuler les cellules. A partir de là une taille optimale peut être déterminée. Cependant en modifiant la taille des pores, la taille des billes pourrait aussi influencer le transport des particules à proximité de la surface des billes.

Nous avons donc réalisé des expériences de capture avec des billes de différents diamètres. Dans les expériences suivantes la vitesse des particules est de  $0,3 \text{ mm.s}^{-1}$  et la concentration en particules libres  $C_{PLO}$  est autour de  $2,5.10^7 \text{ particules.mL}^{-1}$ . Les billes d'alginate utilisées ont les diamètres moyens suivants :  $305 \mu\text{m}$ ,  $722 \mu\text{m}$  ou  $971 \mu\text{m}$ . La Figure 2-16 représente les constantes d'association en fonction de la taille des billes.

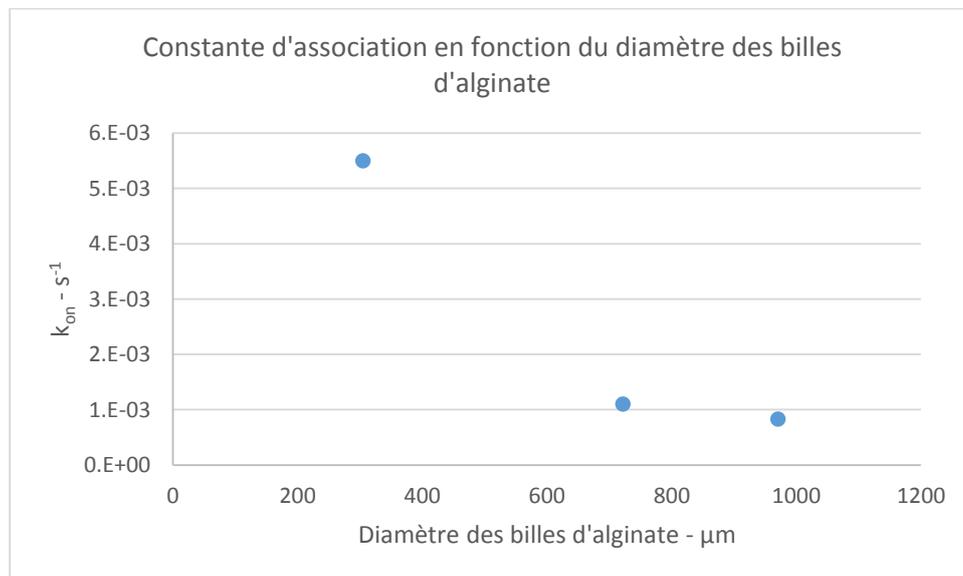


Figure 2-16 : Constantes cinétiques d'association déterminées expérimentalement en fonction de la taille des billes d'alginate. La vitesse de l'écoulement est  $0,3 \text{ mm.s}^{-1}$ .

Sur la Figure 2-16 nous constatons que la cinétique d'association diminue lorsque la taille des billes d'alginate augmente. Comme la vitesse de l'écoulement est identique pour les trois expériences et que la porosité est équivalente pour les trois taille de bille (cf Tableau 2-2) cela signifie que le rendement de la capture  $\frac{k_{on}}{U_p}$ , lui aussi diminue lorsque la taille des billes augmente.

Comme nous l'avons mentionné, lorsque la taille des billes diminue la surface de capture par unité de volume augmente. Cela pourrait être à l'origine de la dépendance de  $k_{on}$  avec la taille des billes. Nous discuterons plus en détails de cet aspect dans la partie suivante.

Pour étudier la cinétique d'association nous nous sommes placés dans le cas où la surface occupée par les particules capturées représente moins de 2 % de la surface de billes d'alginate disponible. La capture se fait donc dans un régime où la surface de billes libre est largement majoritaire. Mais au fur et à mesure que la concentration en particules capturées augmente, le système va sortir de ce régime et la surface libre va décroître de manière significative. Nous nous sommes donc interrogés dans la suite sur l'effet de la présence des particules capturées sur la cinétique d'association.

Cette interrogation est importante dans le cadre du développement d'une technologie de tri cellulaire. En effet le prix de cette technologie est principalement fixé par la quantité d'anticorps utilisée. Cette quantité est proportionnelle à la surface de billes d'alginate. Afin d'avoir un prix de production minimal nous avons donc intérêt à réduire la surface de bille. Par conséquent nous souhaitons occuper la surface des billes à un taux bien supérieur à 2 %. Nous avons donc étudié la capture à des taux d'occupation de la surface des billes plus élevés.

#### 2.1.4.4. Saturation de la surface des billes

Afin d'étudier l'effet de la présence des particules capturées à la surface des billes sur la capture des particules libres, nous avons réalisé une expérience avec des billes d'alginate de 305  $\mu\text{m}$  de diamètre, une vitesse de l'écoulement de 0,3  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  et une concentration  $C_{PLO} = 2,5 \cdot 10^7$  particules. $\text{mL}^{-1}$ . Par rapport aux expériences précédentes nous avons réalisé l'expérience sur un temps quatre fois plus long. Les données expérimentales sont représentées en Figure 2-17.

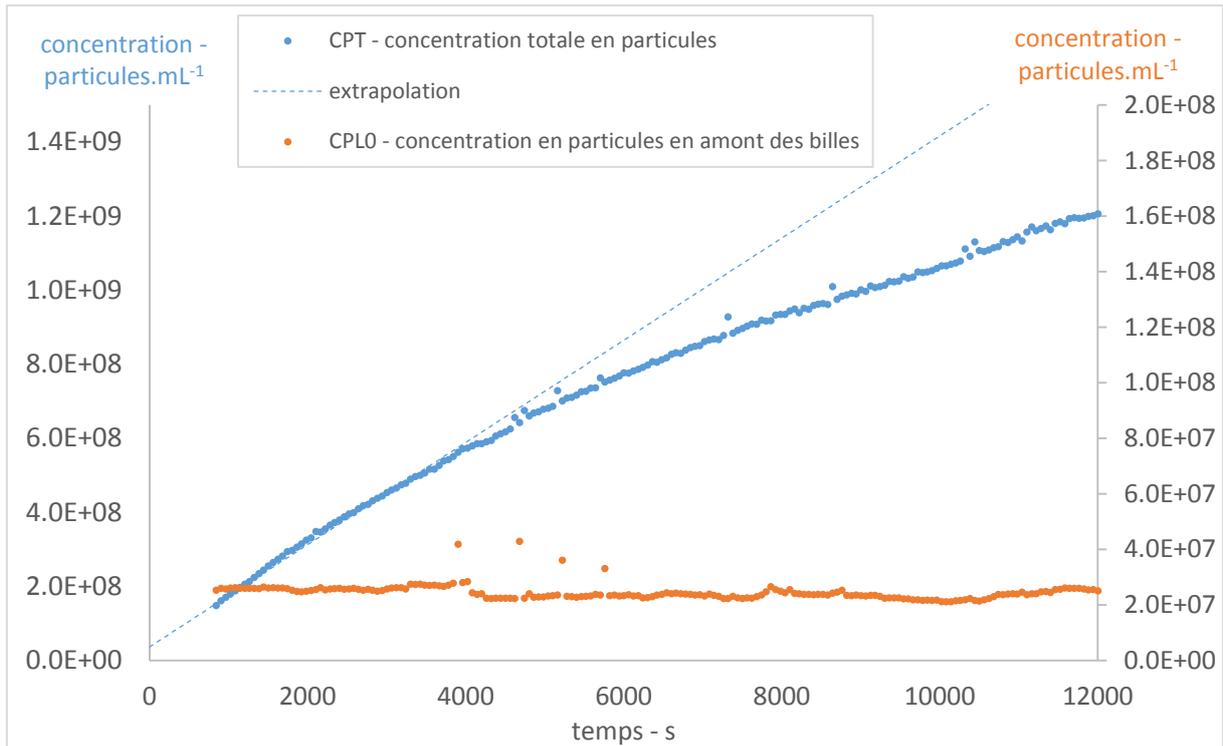


Figure 2-17 : Mesures effectuées durant une expérience de capture. Les mesures expérimentales sont représentées par les points orange et bleus. La concentration totale en particules dans l'empilement de billes d'alginate est représentée en bleu (ordonnées à gauche). La concentration en particules libres en amont de l'empilement est représentée en orange (ordonnées à droite). Les billes d'alginate ont un diamètre de 305  $\mu\text{m}$  et la vitesse de l'écoulement est de 0,3  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Au temps court (inférieure à 3000 secondes), la concentration totale en particules évolue linéairement avec le temps. Pour tracer la courbe bleue en pointillés (ordonnées à gauche) nous avons utilisé l'équation décrivant cette évolution linéaire de  $C_{PT}$  :  $C(t)=1,4\cdot 10^5 * t + 3,7\cdot 10^7$ .

Au temps court la concentration  $C_{PT}$  augmente linéairement avec le temps, et nous avons déterminé que  $k_{on} = 5,5\cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Pour tracer la courbe bleue en pointillés (ordonnées à gauche) nous avons utilisé l'équation décrivant l'évolution linéaire de  $C_{PT}$  avec le temps :  $C(t)=1,4\cdot 10^5 * t + 3,7\cdot 10^7$ . Autour de 4000 secondes la courbe s'infléchit ce qui signifie que le taux de capture diminue.

Avant d'interpréter ce phénomène en termes de taux d'occupation des billes par les particules il faut vérifier que cette diminution du taux de capture n'est pas due à la dissociation des particules. La longueur caractéristique de diminution de la concentration en particules libres est 15 cm. Nous effectuons la mesure sur une distance de 0,5 cm, nous pouvons donc approximer la concentration en particules libres par la concentration en amont des billes  $C_{PL0}$ . Expérimentalement la concentration en particules capturées  $C_{PC}(t)$  est donc déterminée en retranchant  $C_{PL0}$  à  $C_{PT}$  la concentration totale en particules (représentée en bleue en Figure 2-17). La concentration en particules capturées est régie par la constante d'association et de dissociation de la manière suivante :

$$\frac{dC_{PC}(t)}{dt} = k_{on} * C_{PL0} - k_{off} * C_{PC}(t) \quad (2-37)$$

Donc :

$$C_{PC}(t) = \frac{k_{on}}{k_{off}} * C_{PLO} * (1 - \exp(-k_{off} * t)) \quad (2-38)$$

Si on ajuste une courbe avec une équation de la forme  $A*(1 - \exp(B*t))$  à nos données expérimentales on trouve que B est de l'ordre de  $1.10^{-4} s^{-1}$ .

Nous avons constaté que dans les mêmes conditions expérimentales la concentration en particules capturées est constante pendant plus de 12 minutes de rinçage avec du tampon ne contenant pas de particules. Nous pouvons donc écrire d'après l'équation (2-33) que :

$$\exp(-k_{off} * t) > 0.99 \text{ pour } t = 12 \text{ minutes}$$

Donc  $k_{off} < 1,4.10^{-5} s^{-1}$ . Par conséquent ce n'est pas la dissociation des particules qui est à l'origine de la baisse du taux de capture vers 4000 secondes (cf. Figure 2-17).

Un autre phénomène pouvant être à l'origine de la diminution du taux de capture est le fait que la surface de billes d'alginate libre pour la capture diminue. Comme nous l'avons déjà expliqué la concentration en particules capturées  $C_{PC}(t)$  est déterminée en retranchant  $C_{PLO}$  à  $C_{PT}$  la concentration totale en particules. A la fin de l'expérience  $12.10^3 s$ ,  $C_{PC}=1,2.10^9$  particules.mL<sup>-1</sup> ce qui correspond à un taux d'occupation de la surface des billes d'alginate de 3%.

Il est surprenant de constater que le taux de capture diminue significativement alors que seulement 3 % de la surface des billes est occupée. Le système est toujours dans un régime où la surface des billes occupée est négligeable. Dans le raisonnement précédent nous avons considéré que la capture est homogène sur la surface des billes, mais nous ne l'avons pas vérifié. Nous avons donc réalisé une expérience pour imager la répartition spatiale des particules capturées sur les billes d'alginate. Pour cela nous avons effectué une expérience de capture identique à celle représentée par la courbe bleue en Figure 2-17 (les billes d'alginate ont un diamètre de 305  $\mu m$  et la vitesse de l'écoulement 0,3 mm.s<sup>-1</sup>). A la fin de la phase de capture des particules la colonne est rincée avec une solution tampon afin d'éliminer les particules qui n'ont pas été capturées. Ensuite une solution de biotines fluorescentes est incubée dans la colonne. Puis la colonne est de nouveau rincée avec la solution de tampon. Les particules capturées sont fonctionnalisées avec de la streptavidine, la biotine fluorescente va donc se fixer sur les particules. L'image en Figure 2-18 est une image de microscopie confocale de l'empilement de billes.

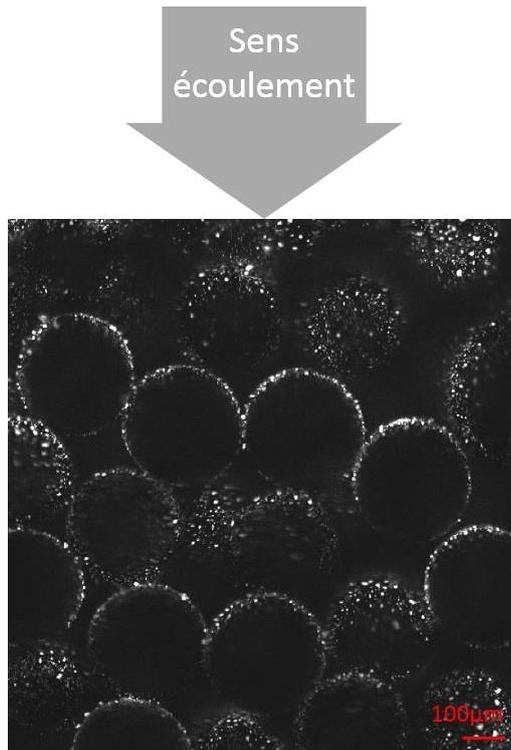


Figure 2-18 : Image de microscopie confocale. La fluorescence est due à la biotine fluorescente qui est fixée aux particules recouvertes de streptavidines (1  $\mu\text{m}$  de diamètre) capturées par les billes d'alginate (305  $\mu\text{m}$  de diamètre).

Nous constatons sur la Figure 2-18 que la capture n'est pas homogène dans l'espace. La répartition est corrélée avec le sens de l'écoulement : elle est plus importante du côté où le fluide arrive. Cependant même en considérant que la capture n'a lieu que sur la moitié de la surface des billes, le taux d'occupation est de 6% ce qui reste faible.

Nous considérons ci-dessus, que les particules occupent une surface sur les billes correspondant à leur taille physique. Cependant si les particules ne s'agrègent pas entre elles, c'est qu'il existe une interaction répulsive. Dans notre système la couche de Debye a une épaisseur de l'ordre du nanomètre. Cette couche ne modifie donc pas significativement la surface occupée par les particules. Les interactions répulsives peuvent aussi être d'origine stérique ou hydrodynamique. La présence des particules à la surface des billes pourrait modifier l'écoulement et modifier la cinétique d'association. Mais nous manquons d'arguments pour étayer ces hypothèses.

### 2.1.5. Conclusion

Ces expériences nous ont permis d'étudier la cinétique d'association de particules micrométriques à la surface de billes d'alginate dans une géométrie de chromatographie. La vitesse de l'écoulement a un effet important sur la cinétique d'association ainsi que sur le rendement de la capture. Lorsque la vitesse augmente la cinétique d'association augmente mais le rendement de la capture diminue. La

taille des billes d'alginate influence aussi la cinétique d'association, plus les billes sont petites plus le taux de rencontre est important. Pour finir notre étude sur la cinétique d'association nous avons finalement constaté qu'elle diminuait lorsque la surface de billes occupée est de l'ordre de 3 à 6 % de la surface totale de billes.

Nous souhaitons maintenant interpréter ces résultats expérimentaux, c'est-à-dire comprendre comment la vitesse de l'écoulement et la taille des billes d'alginate interviennent dans le processus de capture de particules micrométriques à la surface des billes. Nous souhaitons en particulier nous intéresser à l'étape de transport. Pour interpréter nos résultats nous avons donc utilisé la théorie de la filtration colloïdale (CFT) qui décrit en particulier ces phénomènes de transport.

## 2.2. Interprétation des résultats

L'étude de la filtration colloïdale a été développée historiquement pour l'optimisation des unités de filtration industrielles des eaux usées<sup>7</sup>. Aujourd'hui ce domaine de recherche a des applications diverses dans l'environnement pour modéliser le transport de virus et des bactéries dans les eaux souterraines et le développement d'une épidémie<sup>8</sup>. C'est aussi un phénomène important dans la récupération du pétrole.

La recherche dans ce domaine a permis la mise au point de modèles décrivant la rétention de particules colloïdales dans un milieu poreux composé de billes appelées collecteurs. Nous allons utiliser cette théorie afin d'interpréter nos résultats expérimentaux.

### 2.2.1. Les phénomènes physiques à l'origine du transport des particules à proximité des billes

La filtration colloïdale se découpe en deux étapes : le transport des particules à proximité des collecteurs (unités constituant le milieu poreux), puis dans un deuxième temps l'adhésion en elle-même qui est le résultat d'une interaction énergétique entre la particule et la surface du collecteur. Yao en 1968<sup>9</sup> est le premier à donner une description microscopique du phénomène de transport des particules colloïdales en considérant trois mécanismes : la diffusion, la sédimentation et l'interception qui sont représentés en Figure 2-19.

Figure 2-19 : Représentation schématique des trois différents mécanismes de transport des particules à proximité des billes<sup>9</sup>. Les particules sont amenées à proximité des billes grâce à l'interception (c'est à dire l'écoulement), la sédimentation et la diffusion.

Pour quantifier la capture selon ces trois mécanismes il résout une équation de convection-diffusion portant sur la concentration en particules libres. Dans cette équation il ne prend pas en compte les interactions hydrodynamiques.

Le domaine de la filtration colloïdale s'intéresse au cas des billes et de particules solides. Le cas de billes poreuses comme les billes d'alginate n'est pas considéré. Cependant d'après la bibliographie<sup>10,11</sup> la perméabilité d'un gel d'alginate est autour de  $10^{-17} \text{ m}^2$ , alors que la perméabilité de l'empilement de billes est d'après la relation de Kozeny-Carman de l'ordre de  $10^{-10} \text{ m}^2$ . Le fluide s'écoule donc principalement dans les pores de l'empilement des billes. Il est raisonnable en première approximation de considérer la surface des billes d'alginate comme une surface solide.

Dans un premier temps nous allons présenter la description du transport faite par Yao. Bien qu'elle ne soit pas satisfaisante pour interpréter nos données expérimentales elle permet d'appréhender clairement les différents mécanismes en jeu lors du transport. Puis dans un second temps nous nous intéresserons à une équation de corrélation prenant en compte les interactions hydrodynamiques et de VDW.

#### 2.2.1.1. Présentation du modèle simplifié de Yao

Pour résoudre analytiquement l'équation de convection-diffusion Yao simplifie le système en supposant que les trois mécanismes de transport sont indépendants, ce qui n'est évidemment pas le cas dans la réalité. Il considère que chaque collision donne lieu à une capture.

Dans la suite nous considérons une bille autour de laquelle un fluide, qui contient des particules, s'écoule à la vitesse  $U$ . Nous allons estimer le nombre de particules capturées par la bille par unité de

temps selon les trois modes de transport : l'interception, la diffusion et la sédimentation. La concentration en particules est notée  $C(z, t)$  et en amont de la bille elle vaut  $C_{PL0}$ .

### La rencontre par interception

Les particules capturées par interception sont amenées à la surface de la bille grâce à l'écoulement du fluide. Dès qu'une particule touche la surface de la bille elle est capturée. Yao fait l'hypothèse forte que les particules suivent parfaitement les lignes de courant sans être déviées. Le nombre de collisions entre les particules et la bille par unité de temps  $J_{hydro}$  est donné par la formule suivante<sup>12</sup>:

$$J_{hydro} = \frac{3}{2} \left( \frac{R_P}{R_B} \right)^2 * \pi * R_B^2 * U * C_{PL0} \quad (2-39)$$

Le nombre de particules capturées par unité de temps grâce à l'écoulement est proportionnel au flux de particule arrivant sur la bille  $\pi * R_B^2 * U * C_{PL0}$ . Le coefficient de proportionnalité est le rapport des diamètres de la particule et de la bille. L'efficacité de rencontre par interception est défini en normalisant  $J_{hydro}$  par le flux de particules arrivant sur le collecteur :

$$\eta = \frac{\text{nombre de particules capturées par seconde par une bille}}{\text{nombre de particules qui arrivent par seconde sur la bille}} = \frac{\text{flux de capture}}{\text{flux de particules}} \quad (2-40)$$

$$\eta_{hydro} = \frac{J_{hydro}}{\pi * R_B^2 * U * C_{PL}} = \frac{3}{2} \left( \frac{R_P}{R_B} \right)^2 \quad (2-41)$$

L'efficacité de rencontre due à l'écoulement du fluide dépend du rapport de la taille des billes et des particules, par contre elle est indépendante de la vitesse. Ce mécanisme est d'autant plus efficace que les deux objets qui se rencontrent ont des tailles similaires.

### La rencontre par diffusion

Un second mode de transport des particules est la diffusion. Le flux de particules  $j$ , par unité de surface et de temps lié à la diffusion est :

$$j_{diff}(z, t) = -D * \text{grad } C(z, t) \quad (2-42)$$

avec  $D$  la constante de diffusion des particules. Le champ de concentration à proximité de la bille a été déterminé par Levich en 1962 par la résolution de l'équation de convection-diffusion dans le cas stationnaire<sup>13</sup>. En intégrant le flux de particules  $j_{diff}$  sur la surface de la bille on trouve que le nombre de particules capturées par unité de temps par la bille est :

$$J_{diff} = 7.98 * D^{\frac{2}{3}} * U^{\frac{1}{3}} * R_B^{\frac{4}{3}} * C_{PL0} \quad (2-43)$$

Avec  $C_{PL0}$  la concentration en particules loin de la bille et  $R_B$  le diamètre de la bille. On retrouve la même forme de solution que pour le cas sans écoulement :

$$J_{diff} = 4 * \pi * D * C_{PL0} * R_B \quad (2-44)$$

Le nombre de particules capturées par unité de temps par une bille est déterminé par la constante de diffusion, le gradient de concentration et la surface de la bille. Ce qui diffère c'est la forme du gradient de concentration qui en présence d'un écoulement est décrit par :

$$C_{PL0} * \left( \frac{U}{D * R_B^2} \right)^{\frac{1}{3}} = \frac{C_{PL0}}{R_B} * (Pe)^{\frac{1}{3}} \quad (2-45)$$

On retrouve le terme correspondant au gradient simple autour d'une bille immobile  $\frac{C_{PL0}}{R_B}$  pondéré par le nombre de Péclet qui compare le transport diffusif et la convection le long de la bille. Un nombre de Péclet élevé signifie qu'à l'échelle de la bille le transport convectif prédomine sur le transport diffusif. Cela est favorable à la capture par diffusion car la convection permet de maintenir un gradient de concentration plus élevé qu'en absence d'écoulement.

L'efficacité de la capture par diffusion en présence de l'écoulement est donnée par la formule suivante :

$$\eta_{diff} = \frac{7.98 * D^{\frac{2}{3}} * U^{\frac{1}{3}} * R_B^{\frac{4}{3}} * C_{PL0}}{\pi * R_B^2 * U * C_{PL0}} = \frac{7.98}{\pi} \left( \frac{D}{U * R_B} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (2-46)$$

L'efficacité de la capture par diffusion dépend de la vitesse et de la taille de la bille. D'une part l'écoulement est en compétition avec la capture par diffusion. La durée pendant laquelle les particules sont à proximité de la bille et peuvent donc atteindre sa surface est  $\frac{R_B}{U}$ . Lorsque  $U$ , la vitesse de l'écoulement augmente, les particules ont moins de temps pour atteindre la surface des billes par diffusion et donc moins de particules y parviennent. Mais d'autre part l'écoulement a un effet bénéfique sur le gradient de concentration en particules. L'efficacité de la capture varie finalement comme  $U^{-\frac{2}{3}}$ . La taille de la bille d'alginate intervient dans la surface de capture mais aussi dans l'établissement du gradient de concentration, et au final lorsque la taille de la bille augmente, l'efficacité de capture par diffusion diminue.

## La rencontre par sédimentation

La force gravitationnelle est un autre moyen de mettre les particules en mouvement. Les particules sédimentent à la vitesse  $v_{sed}$ :

$$v_{sed} = \frac{2 \cdot R_p^2 \cdot g \cdot (\rho_p - \rho_0)}{9 \cdot \mu} \quad (2-47)$$

Le flux de particules  $j$  par unité de surface et de temps lié à la sédimentation est :

$$j_{sed} = v_{sed} \cdot C(z, t) \quad (2-48)$$

Le champ de concentration est déterminé par l'équation suivante :

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} = -\nabla \cdot (v_{sed} \cdot C(z, t) + \mathbf{U} \cdot C(z, t)) \quad (2-49)$$

Dans le cas stationnaire  $C(z) = C_{PL0}$ . Contrairement au cas de la diffusion le champ de concentration en particules est indépendant de la vitesse  $U$  de l'écoulement. Le nombre de particules capturées par la bille par unité de temps  $J_{sed}$  est donné par la formule suivante:

$$J_{sed} = C_{PL0} \cdot v_{sed} \cdot \pi \cdot R_B^2 \quad (2-50)$$

Le nombre de particules capturées par sédimentation est égal au flux de sédimentation de particules. L'efficacité de la capture par sédimentation (défini par l'équation (2-40)) est :

$$\eta_{sed} = \frac{J_{sed}}{\pi \cdot R_B^2 \cdot U \cdot C_{PL}} = \frac{v_{sed}}{U} \quad (2-51)$$

Comme dans le cas de la diffusion il y a une compétition entre l'écoulement des particules et leur capture par sédimentation. Lorsque la vitesse de l'écoulement augmente, le nombre de particules qui sont amenées sur la bille par unité de temps augmente, cependant le flux de sédimentation lui reste constant. Donc finalement la proportion de particules capturées diminue.

La Figure 2-20 est un graphique issu de l'article de Yao où sont représentées les efficacités de capture théoriques en fonction de la taille des particules capturées.

Figure 2-20 : Graphique tiré de l'article de Yao<sup>9</sup> représentant l'efficacité de capture en fonction de la taille des particules capturées.

On constate que pour des petites particules, en dessous de 1  $\mu\text{m}$ , la diffusion domine le transport. Et pour les particules de taille plus importante c'est la sédimentation qui devient dominante. Il n'y a pas de régime où la capture par interception gouverne le transport.

### Écoulement d'un fluide dans un empilement compact de billes

Nous venons de raisonner sur une bille dans une solution infinie. Cette situation est décrite par l'équation de Stokes :

$$\mu * \Delta \mathbf{U} = \nabla p \quad (2-52)$$

Ainsi que par l'équation de la conservation de la masse pour un fluide incompressible,

$$\nabla \cdot \mathbf{U} = 0 \quad (2-53)$$

Les conditions limites sont  $\mathbf{U} = \mathbf{0}$  sur la surface de la bille et  $\mathbf{U} = \mathbf{U}_0$  à l'infini, avec  $\mathbf{U}_0$  la vitesse de l'écoulement non perturbée par la bille.

Afin d'affiner la description de Yao nous pouvons considérer le transport dans un empilement compact de billes. La condition limite  $\mathbf{U} = \mathbf{U}_0$  à l'infini ne correspond pas à une telle situation. Il faut définir de nouvelles conditions limites pour déterminer l'écoulement. En 1958 Happel s'est intéressé à ce problème et a proposé un modèle simplifié permettant de déterminer le champ de vitesse<sup>14</sup>. Il considère chaque bille de l'empilement entourée d'une couche de fluide d'épaisseur  $b$  (la fraction volumique en billes globale de l'empilement est respectée localement) comme cela est représenté en Figure 2-21.

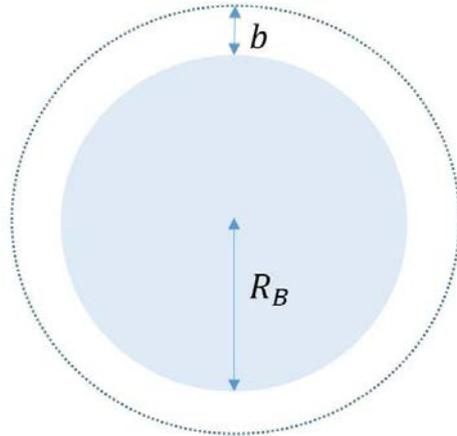


Figure 2-21 : Représentation schématique du modèle « sphere in cell » utilisé par Happel pour modéliser l'écoulement dans un milieu poreux.

Les équations régissant l'écoulement dans la couche de fluide d'épaisseur  $b$  sont toujours l'équation de Stokes et la conservation de la masse pour un fluide incompressible. Mais les conditions limites sont :

- A la surface de la bille : les composantes radiale  $v_r$  et tangentielle  $v_\theta$  de la vitesse sont nulles
- En  $b$  : la composante radiale de la vitesse est nulle et  $\frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} = 0$

Globalement le champ de vitesse est semblable au cas d'une bille dans une solution infinie, mais les lignes de courant sont resserrées et la vitesse est augmentée d'un facteur  $A_s$  qui dépend de la porosité du milieu :

$$A_s = \frac{2*(1-\gamma^5)}{2-3*\gamma+3*\gamma^5-2*\gamma^6} \quad (2-54)$$

$\gamma = \phi^3$  avec  $\phi$  la fraction volumique en bille

$A_s$  a une valeur autour de 30 dans nos expériences, ce n'est donc pas négligeable. Le fait d'avoir un écoulement dans un milieu poreux ne change pas les mécanismes de capture par sédimentation, diffusion et interception. Le principal effet est que la vitesse à considérer n'est pas la vitesse  $U$  en amont de l'empilement de billes mais  $A_s * U$ . Le facteur  $A_s$  modifie les valeurs des flux de capture  $J$  calculés précédemment. On note les flux de capture prenant en compte la structure poreuse  $J^*$ . Le flux de capture par sédimentation est indépendant de la vitesse de l'écoulement donc

$$J_{sed} = J_{sed}^* \quad (2-55)$$

Le flux de capture par diffusion dépend de la vitesse et :

$$J_{\text{diff}}^* = 7.98 * D^{\frac{2}{3}} * (A_s * U)^{\frac{1}{3}} * R_B^{\frac{4}{3}} * C_0 = A_s^{\frac{1}{3}} * J_{\text{diff}} \quad (2-56)$$

Et concernant la capture par interception :

$$J_{\text{hydro}}^* = A_s * J_{\text{hydro}} \quad (2-57)$$

Cela donne pour les efficacités de capture les formules suivantes ( $\eta^*$  est l'efficacité tenant compte de  $A_s$ ) :

$$\eta_{\text{sed}}^* = \frac{v_{\text{sed}}}{U} \quad (2-58)$$

$$\eta_{\text{hydro}}^* = A_s * \frac{3}{2} \left( \frac{R_p}{R_B} \right)^2 \quad (2-59)$$

$$\eta_{\text{diff}}^* = A_s^{\frac{1}{3}} * \frac{7.98}{\pi} \left( \frac{D}{U * R_B} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (2-60)$$

$$\eta_{\text{tot}}^* = \eta_{\text{diff}}^* + \eta_{\text{hydro}}^* + \eta_{\text{sed}}^* \quad (2-61)$$

La structure poreuse en augmentant localement la vitesse d'écoulement augmente l'efficacité de capture par interception et par diffusion.

Cette première partie nous permet de comprendre quels sont les mécanismes de transport permettant aux particules d'approcher la surface des billes. Cela permet d'évaluer le rôle de la taille des billes et de l'écoulement sur la rencontre entre les particules et les billes. Cependant la description ci-dessus néglige les interactions entre les surfaces et en particulier elle ne considère pas les interactions hydrodynamiques qui apparaissent lorsque les particules approchent de la surface de la bille. Or cette interaction diverge et empêche l'adhésion entre les surfaces. Nous ne pouvons donc pas interpréter nos résultats avec un modèle ne prenant pas en compte ces interactions. Nous allons donc dans la suite intégrer les interactions entre les deux surfaces qui apparaissent lorsque la distance entre les objets est de l'ordre de la taille des particules.

### 2.2.1.2. Les interactions entre les surfaces

Lorsque deux surfaces solides se rapprochent à la vitesse  $V$  une force d'origine visqueuse évoluant comme l'inverse de la distance  $h$  entre les deux objets apparaît :

$$F_V = - 6 * \pi * R_p * V * \left( 1 + \frac{R_p}{h} \right) \quad (2-62)$$

Cette force devient importante lorsque la distance entre les objets est de l'ordre de la taille des particules, c'est-à-dire 500 nm. Or l'interaction permettant l'adhésion entre les billes et les particules a lieu à une distance de l'ordre de 1 nm. Cette force empêche donc l'adhésion entre les particules et

les billes si aucune autre interaction attractive ne la contrebalance. La description de Yao fait une simplification qui n'est pas justifiée dans notre cas. Et notre système n'est pas assez bien caractérisé d'un point de vue des interactions colloïdales pour que nous puissions à priori négliger la répulsion hydrodynamique. Cependant il n'existe pas de résolution analytique de l'équation de convection-diffusion prenant en compte les interactions hydrodynamiques et colloïdales. La résolution de ce type d'équation est numérique. Cela permet d'établir des équations de corrélation qui permettent de calculer les efficacités de transport<sup>15</sup>. A priori ces équations ne sont pas pertinentes pour caractériser notre système car elle ne repose pas sur une résolution rigoureuse et universelle de l'équation de convection-diffusion. De plus elle nécessite de connaître un certain nombre de paramètres comme la constante d'Hamaker ou bien les potentiels de surfaces, qui nous sont inconnus pour notre système. Mais à posteriori, si elles s'ajustent bien aux données expérimentales, elles permettent de donner une interprétation aux phénomènes observés.

En plus de l'interaction hydrodynamique, les surfaces interagissent entre elles via des interactions de type électrostatiques, et de VDW. Ces interactions sont modélisées par la théorie DLVO. Cependant l'interaction globale à cette échelle est compliquée à modéliser. Les modèles décrivent correctement les données expérimentales lorsque les interactions colloïdales entre les particules et les billes sont favorables, c'est-à-dire lorsque la double couche électronique est attractive ou bien lorsque la répulsion est fortement réduite par les ions présents dans la solution<sup>16,17,18</sup>. Quand la répulsion est importante les modèles prédisent que la capture doit être quasiment inexistante, et sous-estiment grandement les résultats expérimentaux<sup>19,20</sup>. Une des difficultés est la prise en compte de l'hétérogénéité des surfaces dans les modèles. La théorie DLVO suppose que les surfaces sont lisses et homogènes. Or expérimentalement on constate par exemple que la capture de bactéries sur des billes de verre est d'autant plus efficace que la surface des billes est rugueuse<sup>21</sup>. Les surfaces présentent une rugosité qui peut avoir une influence sur les interactions hydrodynamiques et colloïdales même lorsqu'elle est de l'ordre du nanomètre<sup>22</sup>. Il existe aussi des hétérogénéités dans le potentiel zeta ou de surface qui vont perturber localement le profil énergétique calculé à partir des grandeurs moyennes<sup>19</sup>. On peut ajouter à cela les limites classiques de la théorie DLVO qui ne considère que les interactions électrostatiques et de VDW (d'autres interactions peuvent intervenir comme les interactions hydrophobes, les phénomènes d'hydratation, la répulsion stérique), et qui suppose que les interactions sont additives.

Il n'y a donc pas de modèle satisfaisant permettant de décrire l'interaction entre une particule colloïdale et une bille à cette échelle de manière générale. Dans le cas particulier où l'interaction répulsive de la double couche électrique est négligeable, certaines équations comme celle de Tufenkji

& al en 2003<sup>16</sup>, donne une bonne prédiction des données expérimentales. Les efficacités de capture s'expriment de la manière suivante :

$$\eta_{\text{hydro}} = 0.55 * A_s * N_r^{1.55} * N_{Pe}^{-0.125} * N_{VdW}^{0.125} \quad (2-63)$$

$$\eta_{\text{sed}} = 0.475 * N_r^{-1.35} * N_{Pe}^{-1.11} * N_{VdW}^{0.053} * N_{gr}^{1.11} \quad (2-64)$$

$$\eta_{\text{diff}} = 2.4 * A_s^{1/3} * N_r^{-0.081} * N_{Pe}^{-0.715} * N_{VdW}^{0.052} \quad (2-65)$$

$$\eta_{\text{tot}} = \eta_{\text{hydro}} + \eta_{\text{sed}} + \eta_{\text{diff}} \quad (2-66)$$

Avec les nombres sans dimensions suivants :

$$N_r = \frac{R_p}{R_B} \quad (2-67)$$

$$N_{Pe} = \frac{U * R_B}{D} \quad (2-68)$$

$$N_{VdW} = \frac{H}{kT} \quad (2-69)$$

$$N_{gr} = \frac{4}{3} * \frac{\pi * R_p^4 * (\rho_p - \rho_0) * g}{kT} \quad (2-70)$$

Avec H la constante de Hamaker,  $\rho_p$  la masse volumique des particules, et  $\rho_0$  la masse volumique du fluide. La détermination de ces équations repose sur la régression des nombres sans dimension (supposés gouverner la capture), sur des efficacités de capture déterminées grâce à la résolution numérique de l'équation de convection-diffusion qui prend en compte les interactions de VDW et hydrodynamiques. La condition limite utilisée dans cette approche pour la capture des particules est celle du « perfect skin model » : dès qu'une particule touche la surface de la bille, elle est capturée. Les prédictions de Tufenkji, ne décrivent donc que le transport des particules jusqu'à la surface des billes.

Nous allons dans la suite comparer nos données expérimentales, avec les prédictions issues de ce modèle.

## 2.2.2. Interprétation des données expérimentales

Afin de comparer nos données expérimentales avec les prédictions du modèle de Tufenkji il faut relier l'efficacité de capture  $\eta$  (la constante cinétique de capture d'une bille normalisée par le flux de particules arrivant sur la bille) et la constante d'association  $k_{on}$  (le nombre de particules capturées par unité de temps et de volume). Pour cela nous allons passer par N, le nombre de particules capturées dans un volume  $\partial V$ , dans lequel la concentration en particules  $C_{PL}(t)$  est constante. En fonction de  $k_{on}$  on a:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = k_{on} * C_{PL} * (1 - \phi) * \partial V \quad (2-71)$$

Ou bien en fonction de l'efficacité de capture totale,  $\eta$  (qui est la somme des efficacités de capture pour chaque type de transport):

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \eta * \pi * R_B^2 * U * C_{PL} * \frac{\partial V * \phi}{\frac{4}{3} * \pi * R_B^3} \quad (2-72)$$

On en déduit que :

$$k_{on} = \eta * \frac{3 * \phi * U_P}{4 * R_B} \quad (2-73)$$

Dans la grandeur  $\eta$  il y a en plus une notion de rendement qui est absente dans  $k_{on}$ .

La Figure 2-22 représente l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la vitesse de l'écoulement  $U$ .

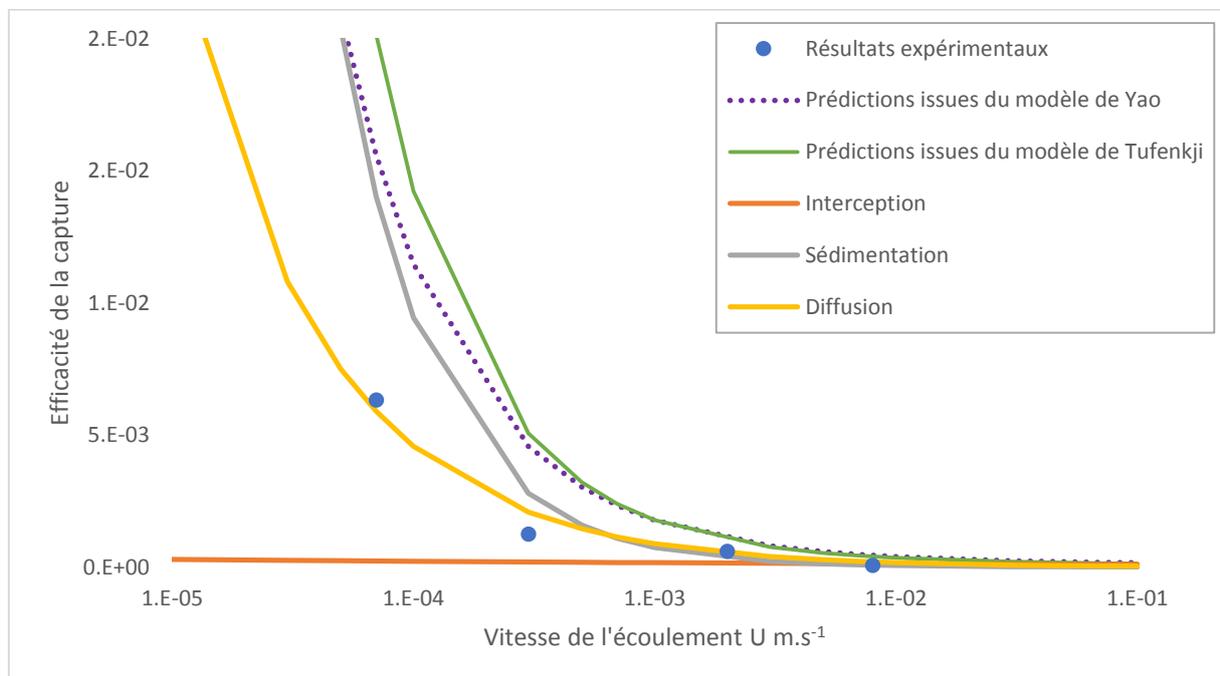


Figure 2-22 : Graphique représentant l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la vitesse de l'écoulement. Les points bleus sont les résultats expérimentaux. La courbe verte est l'efficacité de capture totale selon le modèle de Tufenkji (équation (2-66)). La courbe jaune est l'efficacité de capture par diffusion selon le modèle de Tufenkji (équation (2-65)). La courbe grise est l'efficacité de capture par sédimentation selon le modèle de Tufenkji (équation (2-64)). La courbe orange est l'efficacité de capture par interception selon le modèle de Tufenkji (équation (2-63)). Les pointillés violets représentent l'efficacité de capture totale (sédimentation, interception et diffusion) selon le modèle de Yao (équation (2-61)). Le rayon des billes est  $300 \mu\text{m}$ , le rayon des particules est  $5.10^{-7} \text{ m}$ , la température est  $298 \text{ K}$ , la viscosité est  $1.10^{-3} \text{ Pa.s}$ , la constante de Hamaker est  $2.10^{-20} \text{ J}$ , la masse volumique des particules est  $2,5.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , la masse volumique du fluide est  $1.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , et la porosité est  $0,46$ .

Le modèle Tufenkji donne un ordre de grandeur qui correspond à nos données expérimentales et il nous permet d'interpréter la décroissance de l'efficacité lorsque la vitesse de l'écoulement augmente. Afin de distinguer les mécanismes en jeu pour la rencontre nous avons tracé en Figure 2-22 les efficacités de capture selon chaque type de transport, en gris la sédimentation, en jaune la diffusion

et en orange l'interception. Dans nos conditions expérimentales la capture est très efficace aux faibles vitesses, en dessous du  $\text{mm.s}^{-1}$ , grâce à la sédimentation. Lorsque la vitesse augmente le transport par sédimentation diminue de manière importante. D'après la description de Yao, cela est dû à l'écoulement qui emporte les particules avant qu'elles aient atteint la surface des billes grâce à la sédimentation. Pour des vitesses supérieures au  $\text{mm.s}^{-1}$  la diffusion et l'interception deviennent des modes de transport significatifs en plus de la sédimentation.

Les efficacités de capture par bille sont inférieures à 1% ce qui est faible. Pour avoir une capture avec un meilleur rendement, il faut multiplier le nombre de billes rencontrées, c'est-à-dire augmenter la longueur de la colonne.

La Figure 2-23 représente l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la taille des billes.

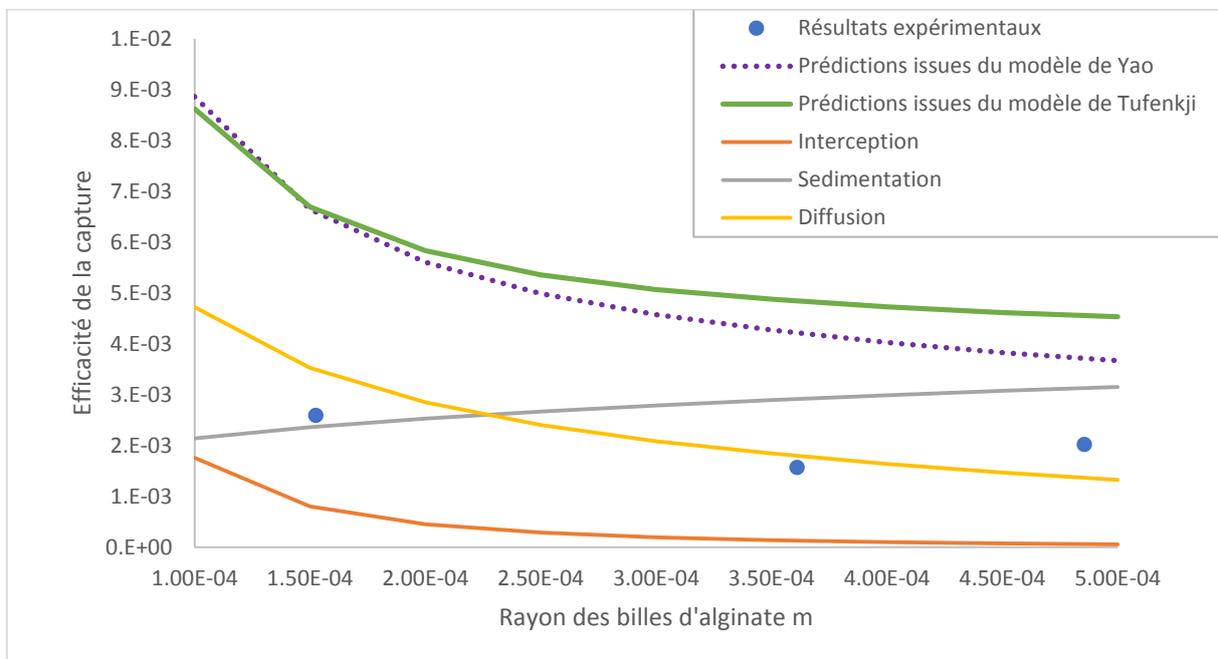


Figure 2-23 : Graphique représentant l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la taille des billes. Les points bleus sont les résultats expérimentaux. La courbe verte est l'efficacité de capture totale selon le modèle de Tufenkji (équation (2-66)). La courbe jaune est l'efficacité de capture par diffusion selon le modèle de Tufenkji (équation (2-65)). La courbe grise est l'efficacité de capture par sédimentation déterminée selon le modèle de Tufenkji (équation (2-64)). La courbe orange est l'efficacité de capture par interceptions selon le modèle de Tufenkji (équation (2-63)). Les pointillés violets représentent l'efficacité de capture totale (sédimentation, interception et diffusion) selon le modèle de Yao (équation (2-61)). La vitesse de l'écoulement est  $0,3 \text{ mm.s}^{-1}$ , le rayon des particules est  $5.10^{-7} \text{ m}$ , la température est  $298 \text{ K}$ , la viscosité est  $1.10^{-3} \text{ Pa.s}$ , la constante de Hamaker est  $2.10^{-20} \text{ J}$ , la masse volumique des particules est  $2,5.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , la masse volumique du fluide est  $1.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , et la porosité est 0,50 pour les rayons supérieurs à  $400 \mu\text{m}$ , 0,46 pour les rayons compris entre  $250$  et  $350 \mu\text{m}$ , et 0,4 pour les rayons inférieurs à  $350 \mu\text{m}$ .

Le modèle Tufenkji donne un ordre de grandeur raisonnable des efficacités de capture en comparaison avec nos données expérimentales. Il nous permet d'interpréter la décroissance de l'efficacité lorsque le rayon des billes d'alginate augmente. Afin de distinguer les mécanismes en jeu pour la rencontre,

nous avons tracé en Figure 2-23, les efficacités de capture selon chaque type de transport, en gris la sédimentation, en jaune la diffusion et en orange l'interception. D'après le modèle de Tufenkji, pour les rayons autour de 150  $\mu\text{m}$  la diffusion est le mode de transport le plus important mais la sédimentation et l'interception sont aussi présentes. Lorsque le rayon de la bille augmente, cela entraîne la diminution de l'efficacité de capture par diffusion et par interception. D'après la description de la diffusion par Yao cela est dû au gradient de concentration de particules qui évolue comme  $R_B^{-\frac{2}{3}}$ . Concernant l'interception, cela est concordant avec la formule (2-41), selon laquelle la rencontre par interception est d'autant plus importante que le rapport de taille entre les objets est petit. Par contre d'après les prédictions de Tufenkji, l'efficacité de transport par sédimentation augmente avec la taille des billes. Cela n'est pas prédit par la description de Yao, c'est donc un effet lié aux interactions entre les surfaces.

Il est intéressant de considérer la répartition spatiale des particules capturées en fonction du mode de transport permettant la capture. La capture par interception a seulement lieu sur la face de la bille où le flux arrive. La capture par sédimentation a seulement lieu sur la face supérieure vis-à-vis de la gravité. La capture par diffusion a lieu sur toute la surface de la bille, mais elle est plus importante du côté où le flux arrive car le gradient de concentration est plus important du côté où le flux arrive. En Figure 2-18 nous observons que la capture a lieu sur toute la surface des billes mais elle est asymétrique. Il y a plus de particules sur la face des billes du côté où le flux arrive, qui est aussi la face où les particules sédimentent. L'expérience a été réalisée avec des particules de 150  $\mu\text{m}$  de rayon et une vitesse d'écoulement de 0,3  $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ . D'après les prédictions de Tufenkji, dans ces conditions les trois modes de transport ont une importance équivalente. Cela est donc cohérent avec la répartition des particules capturées que nous avons observée en Figure 2-18.

### 2.2.3. Conclusion

Nos données expérimentales nous ont permis de remonter à l'efficacité de capture d'une bille, qui est au mieux de l'ordre de  $10^{-3}$ . Cette valeur est faible mais nous verrons dans le prochain chapitre qu'elle permet tout de même d'obtenir un bon rendement sur la colonne complète.

Nos résultats peuvent être décrits correctement par les modèles de la filtration colloïdale, et en particulier par l'équation de Tufenkji qui quantifie le transport de particules colloïdales à la surface d'une bille en prenant en compte les interactions hydrodynamiques. Ce modèle de Tufenkji présente certaines limitations, il ne décrit pas ce qui se passe d'un point de vue physique et il repose sur des simulations numériques. Cependant il a été validé sur de nombreuses données expérimentales. Et les prédictions qui en sont issues s'ajustent bien à nos données expérimentales. Cela nous permet d'interpréter nos observations en fonction de la vitesse de l'écoulement ou bien de la taille des billes

en termes de transport. Et au final, cette équation est un moyen de réfléchir au dimensionnement d'une expérience de chromatographie cellulaire.

## 2.3. Conclusion

Durant ce chapitre nous avons souhaité étudier le transport de particules à proximité de billes en empilement compact. La première difficulté réside dans le fait de ne mesurer que la cinétique de cette étape. Lorsqu'on étudie une réaction a priori le transport et la formation du lien interviennent dans la cinétique. Pour cela nous avons conçu un système d'étude expérimentale où la capture est cinétiquement limitée par le transport et non par la formation du lien : la capture de particules micrométriques par des billes d'alginate via une interaction électrostatique. La seconde difficulté réside dans le fait de ne mesurer que la constante d'association. De nombreux phénomènes peuvent perturber la mesure, comme les phénomènes de dissociation ou bien la saturation des surfaces de capture. De plus pour avoir une quantification précise il faut mesurer le phénomène d'association directement et non pas par une mesure indirecte (tel qu'un dosage en retour). Conscients de toutes ces contraintes nous avons développé un protocole et un dispositif expérimental originaux nous permettant d'avoir accès simplement à la constante d'association. L'empilement de billes d'alginate se trouve dans un capillaire en verre. Les particules utilisées absorbent la lumière, nous pouvons donc mesurer leur capture sur les billes par densité optique. Nous nous plaçons dans des conditions expérimentales où les phénomènes de dissociation sont négligeables et où la capture des particules n'est pas limitée par la présence d'autres particules déjà présentes à la surface des billes. Nous observons donc bien le phénomène d'association des particules à la surface des billes.

Nous avons étudié l'influence de la vitesse d'écoulement des particules et de la taille des billes. Nous avons constaté que l'efficacité de capture diminue lorsque la vitesse d'écoulement augmente et lorsque la taille des billes augmente.

Les cinétiques de capture mesurées peuvent s'interpréter grâce à la cinétique de collision due à l'interception, la sédimentation et la diffusion des particules. Les particules sont amenées jusqu'à l'empilement de billes grâce à l'écoulement. Mais ensuite la rencontre avec la surface des billes est permise par la sédimentation et la diffusion des particules.

Afin de décrire la chromatographie d'affinité nous allons maintenant nous intéresser à l'interaction spécifique dans son ensemble. Est-ce que le transport est limitant ? Est-ce que la formation du lien est limitant ? Est-ce que selon la vitesse on change de régime ? Il est important de pouvoir répondre à ces questions afin de maîtriser la chromatographie cellulaire et de développer une technologie performante.

## 2.4. Bibliographie

1. Cohen-Tannoudji, L. *et al.* Measuring the kinetics of biomolecular recognition with magnetic colloids. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 108301 (2008).
2. Nolan, G. T. & Kavanagh, P. E. The size distribution of interstices in random packings of spheres. *Powder Technol.* **78**, 231–238 (1994).
3. ROCCA, A. & MONGE, J. C. Les forces de cisaillement endothéliales : Impact sur l'athérosclérose. *CARDIOLOGIE Conférences scientifiques* (2007).
4. Aïm, R. B. & Goff, P. L. Effet de paroi dans les empilements désordonnés de sphères et application à la porosité de mélanges binaires. *Powder Technol.* **1**, 281–290 (1968).
5. Carman, P. C. Fluid flow through granular beds. *Chem. Eng. Res. Des.* **75**, S32–S48 (1997).
6. Guyon, E., Hulin, J.-P. & Petit, L. *Hydrodynamique physique*. (CNRS EDITIONS, 2001).
7. D, L. & J, N. Granular media filtration: old process, new thoughts. (2006). at <http://www.iwaponline.com/accesdistant.upmc.fr/wst/05307/wst053070001.htm>
8. Tan, Y., Gannon, J. T., Baveye, P. & Alexander, M. Transport of bacteria in an aquifer sand: Experiments and model simulations. *Water Resour. Res.* **30**, 3243–3252 (1994).
9. Yao, K.-M., Habibian, M. T. & O'Melia, C. R. Water and waste water filtration. Concepts and applications. *Environ. Sci. Technol.* **5**, 1105–1112 (1971).
10. Nguyen, V. B., Wang, C. X., Thomas, C. R. & Zhang, Z. Mechanical properties of single alginate microspheres determined by microcompression and finite element modelling. *Chem. Eng. Sci.* **64**, 821–829 (2009).
11. Wang, X.-M. & Waite, T. D. Gel layer formation and hollow fiber membrane filterability of polysaccharide dispersions. *J. Membr. Sci.* **322**, 204–213 (2008).
12. Russel, W. B., Saville, D. A. & Schowalter, W. R. *Colloidal Dispersions*. (Cambridge University Press, 1989).
13. Levich, veniamin G. *Physicochemical hydrodynamics*. (Prentice Hall, 1962).

14. Happel, J. Viscous flow in multiparticle systems: Slow motion of fluids relative to beds of spherical particles. *AIChE J.* **4**, 197–201 (1958).
15. Nelson, K. E. & Ginn, T. R. New collector efficiency equation for colloid filtration in both natural and engineered flow conditions. *Water Resour. Res.* **47**, W05543 (2011).
16. Tufenkji, N. & Elimelech, M. Correlation Equation for Predicting Single-Collector Efficiency in Physicochemical Filtration in Saturated Porous Media. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 529–536 (2003).
17. Fitzpatrick, J. A. & Spielman, L. A. Filtration of aqueous latex suspensions through beds of glass spheres. *J. Colloid Interface Sci.* **43**, 350–369 (1973).
18. Elimelech, M. Kinetics of capture of colloidal particles in packed beds under attractive double layer interactions. *J. Colloid Interface Sci.* **146**, 337–352 (1991).
19. Ryan, J. N. & Elimelech, M. Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **107**, 1–56 (1996).
20. Nathalie Tufenkji\*, † and Elimelech‡, M. Deviation from the Classical Colloid Filtration Theory in the Presence of Repulsive DLVO Interactions. (2004). at <<http://pubs.acs.org.accessdistant.upmc.fr/doi/abs/10.1021/la0486638>>
21. Shellenberger, K. & Logan, B. E. Effect of Molecular Scale Roughness of Glass Beads on Colloidal and Bacterial Deposition. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 184–189 (2002).
22. Bhattacharjee, S., Ko, C.-H. & Elimelech, M. DLVO Interaction between Rough Surfaces. *Langmuir* **14**, 3365–3375 (1998).

---

## 3. La capture spécifique

---

Afin de compléter notre description de la chromatographie cellulaire d'affinité, nous allons dans ce chapitre étudier la cinétique de capture spécifique. Cette étude a nécessité de travailler sur la fonctionnalisation des billes, que nous présentons donc dans un premier temps. Nous exposerons ensuite nos résultats sur la capture spécifique de globules rouges. A l'aide de ces résultats nous détaillerons comment cette méthode peut être développée à grande échelle.

### 3.1. La fonctionnalisation des billes

#### 3.1.1. Introduction

La fonctionnalisation de la surface de capture est un aspect primordial dans le développement d'un système de tri cellulaire car elle est indispensable au dispositif développé et les anticorps sont des molécules qui coûtent très cher. Par exemple 100 µg d'anticorps anti-CD34 (spécifiques des cellules souches hématopoïétiques) pour la recherche sont vendus 440 euros chez Abcam. Et un traitement thérapeutique à base d'anticorps peut atteindre un coût de 20 000 dollars par an<sup>1</sup>. Le greffage des billes doit donc être optimisé pour avoir la meilleure capture en termes de rendement et de pureté, mais aussi afin d'en limiter le coût de production.

La fonctionnalisation de surface avec des anticorps est courante. La bibliographie sur ce sujet indique que l'activité biologique peut être diminuée par rapport à l'activité de l'anticorps libre en solution à cause d'un greffage qui oriente les anticorps aléatoirement sur la surface<sup>2</sup>. Pour éviter ce problème on peut forcer l'orientation de l'anticorps en le faisant interagir dans un premier temps avec les cellules en solution. Il faut ensuite fixer la cellule avec l'anticorps sur les billes. Pour cela nous avons utilisé le couple streptavidine-biotine. La biotine est une molécule de 244 g.mol<sup>-1</sup> complémentaire de la streptavidine, une protéine de 60 kDa. La liaison spécifique streptavidine-biotine possède la constante d'association la plus forte connue à ce jour<sup>3</sup> :  $10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$ . Les anticorps utilisés sont donc préalablement biotinylés. Ils réagissent avec les cellules présentant l'antigène complémentaire comme cela est représenté en Figure 3-1.

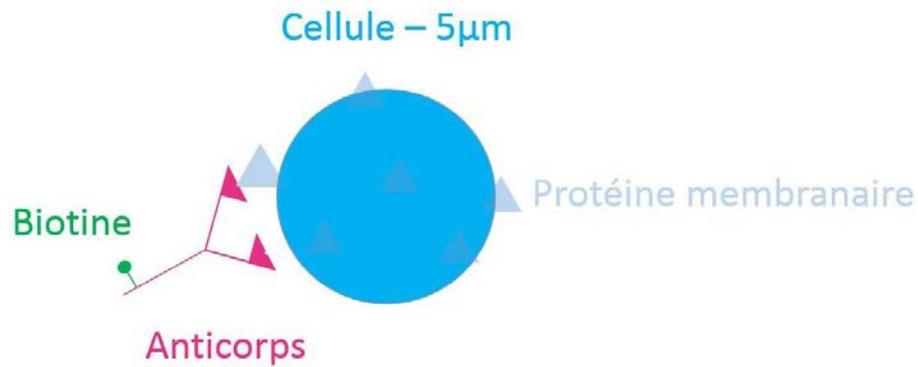


Figure 3-1 : Représentation schématique de l'interaction entre une cellule présentant un certain type de protéines membranaires, et l'anticorps biotinylé complémentaire.

La biotinylation des anticorps est une réaction largement utilisée, Miltenyi commercialise un kit spécifiquement pour cette application (One-Step Antibody Biotinylation Kit), où certains anticorps sont commercialisés déjà biotinylés.

Les billes d'alginate sont fonctionnalisées avec de la streptavidine afin de capturer spécifiquement les cellules ayant réagi avec les anticorps biotinylés (cf. Figure 3-2).

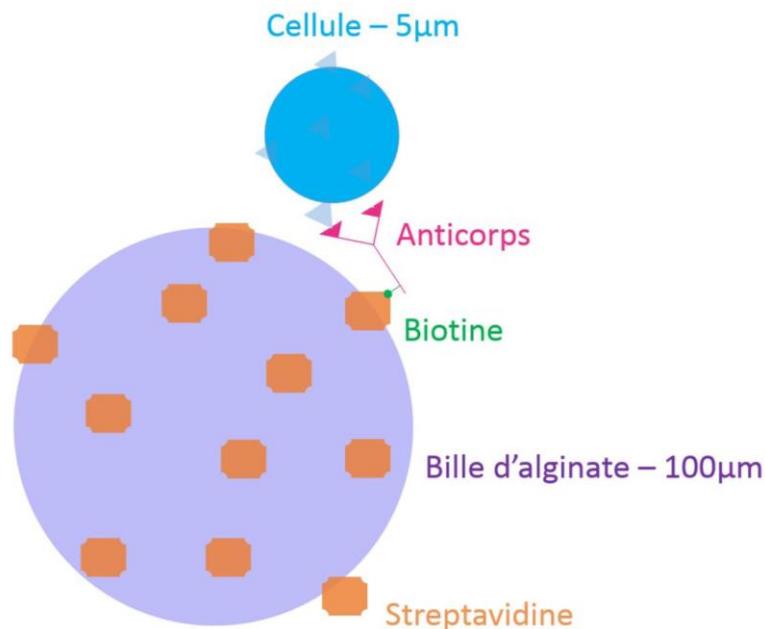


Figure 3-2 : Représentation schématique de l'interaction spécifique entre les billes d'alginate fonctionnalisées avec de la streptavidine et les cellules marquées par un anticorps biotinylé. Cette construction permet la capture spécifique d'un type cellulaire à la surface d'une bille d'alginate.

La streptavidine possède quatre sites de fixation de la biotine, la problématique de l'orientation est donc moins forte que pour le greffage des anticorps. De plus avec cette stratégie il est possible de facilement changer d'anticorps et de trier un nouveau type cellulaire. Par contre si l'anticorps est greffé à la surface de la bille il faut optimiser le greffage pour chaque nouvel anticorps utilisé. Cette stratégie

est d'ailleurs identique à celle utilisée dans les immuno-essais. Dans cette thèse nous avons donc travaillé sur la fonctionnalisation des billes d'alginate avec de la streptavidine.

Nous souhaitons développer une technique de tri pour des applications thérapeutiques il est donc important de vérifier que les composants utilisés ne sont pas toxiques. L'alginate et les anticorps, comme nous l'avons vu précédemment, sont déjà utilisés pour des applications médicales. Concernant la biotine et l'avidine (un analogue de la streptavidine), ces deux composés ont été utilisés dans une technologie de tri cellulaire ayant reçu des autorisations pour des essais cliniques en Europe et aux Etats-Unis<sup>4</sup>.

### 3.1.2. Fonctionnalisation des billes d'alginate

#### 3.1.2.1. Le greffage de la streptavidine

La streptavidine est greffée sur l'alginate grâce à la formation d'une liaison amide. La streptavidine est une protéine, qui possède donc des fonctions amines, et l'alginate est un polysaccharide, qui contient donc de nombreuses fonctions acides carboxyliques. La réaction est représentée en Figure 3-3.

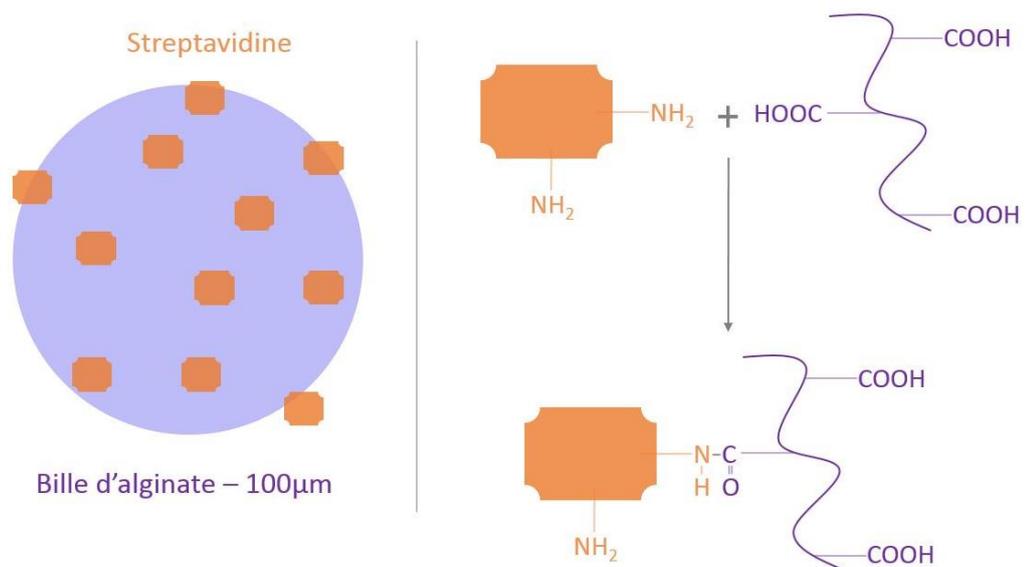


Figure 3-3 : Représentation schématique de la réaction permettant de lier de manière covalente la streptavidine à une bille d'alginate. Les fonctions amines peuvent former des liaisons amides avec les fonctions acides carboxyliques d'un brin d'alginate.

Cette réaction est faite en présence de deux catalyseurs l'EDC (*N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride) et le s-NHS (*N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt). Les billes sont dans un premier temps greffées, puis elles sont lavées pendant 24 heures dans un tampon afin d'éliminer l'EDC, le s-NHS et la streptavidine qui ont diffusé dans les billes mais qui ne se sont pas fixés.

Dans un premier temps nous avons utilisé pour le greffage de la streptavidine fluorescente. Les billes sont observées en microscopie confocale (cf. Figure 3-4, image de droite).

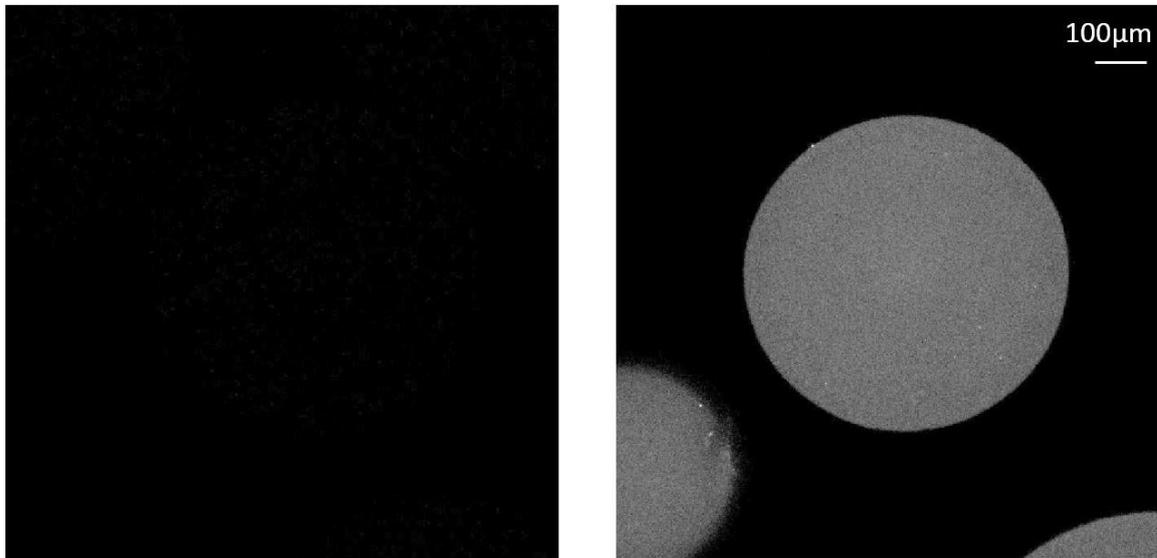


Figure 3-4 : Images de microscopie confocale de billes d'alginate. Sur l'image de droite la bille a été greffée avec de la streptavidine fluorescente en présence d'EDC et de s-NHS. Sur l'image de gauche la bille a été greffée avec de la streptavidine fluorescente en absence d'EDC et de S-NHS. La streptavidine utilisée est fonctionnalisée avec de l'Alexa Fluor 555. La longueur d'onde d'excitation est 543 nm, et le filtre d'émission est 605/75 nm.

Sur l'image de droite de la Figure 3-4 la bille d'alginate observée possède une fluorescence correspondant à celle de la streptavidine. Le signal de fluorescence n'est pas seulement émis à la surface de la bille, il provient de la bille dans son ensemble. Cela est cohérent avec le fait que le gel d'alginate est un réseau en trois dimensions dont la taille des pores peut atteindre 16 nanomètres<sup>5</sup>. La streptavidine a une taille de l'ordre de 5 à 10 nanomètres<sup>6</sup>, elle peut donc diffuser à l'intérieur de la bille. Afin de s'assurer que la fluorescence est émise par des molécules de streptavidines greffées à l'alginate et pas par des molécules libres nous avons réalisé une expérience témoin. Les billes d'alginate sont mises en présence de la même quantité de streptavidines fluorescentes mais sans EDC ni s-NHS (indispensable à la réaction). Leur observation en microscopie confocale est montrée en Figure 3-4 sur l'image de gauche. Les billes n'émettent aucun signal de fluorescence (dans les mêmes conditions d'observation que celles utilisées précédemment). Le signal de fluorescence émis par la bille en Figure 3-4 à droite est donc bien dû à des streptavidines greffées avec l'alginate.

### 3.1.2.2. La réactivité de la streptavidine greffée

Il ne suffit pas que la streptavidine soit greffée sur les billes, elle doit être réactive pour interagir avec de la biotine. Pour tester cette propriété nous avons greffé des billes d'alginate avec de la streptavidine non fluorescente. A la suite du greffage les billes sont lavées afin d'éliminer la streptavidine libre ayant diffusé dans les billes. Puis les billes sont mises en présence de biotines fluorescentes. L'expérience est

réalisée en parallèle avec des billes témoins non greffées avec de la streptavidine. Nous constatons que la streptavidine greffée interagit spécifiquement avec la biotine fluorescente. Le protocole de greffage mis au point permet donc de greffer de la streptavidine sur les billes d'alginate tout en conservant sa réactivité vis-à-vis de la biotine.

Afin de tester la capture de cellules via l'interaction streptavidine-biotine avec un système plus réaliste, nous avons par la suite utilisé des particules micrométriques que nous avons fonctionnalisées avec de la biotine. Les billes d'alginate sont mises en présence de ces particules ( $3.10^{11}$  particules.mL<sup>-1</sup>) pendant deux heures. Nous avons choisi ce temps car pour l'application finale les cellules doivent être triées en moins de deux heures. Le principe de l'expérience est représenté en Figure 3-5.

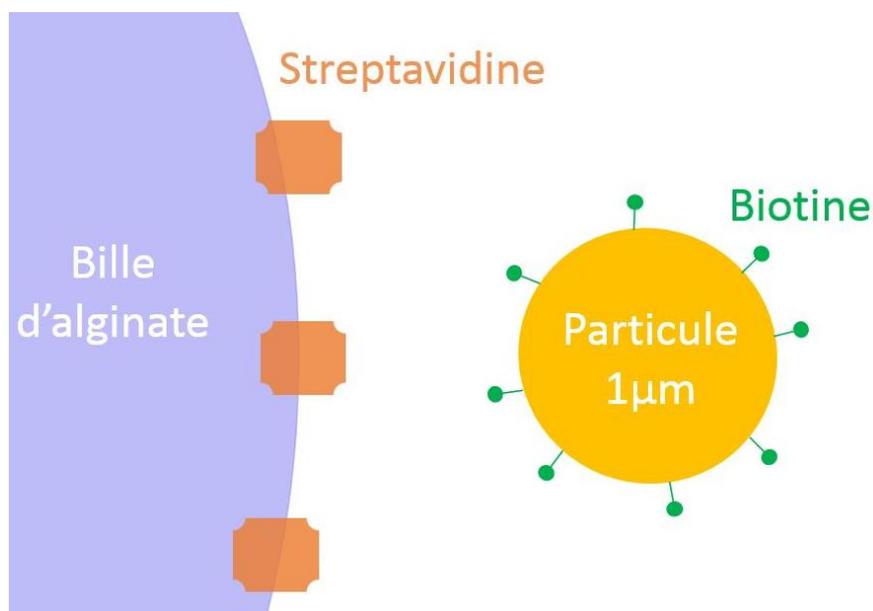


Figure 3-5 : Représentation schématique du principe de l'expérience permettant de tester la réactivité de la streptavidine greffée sur les billes d'alginate. Les billes d'alginate sont mises en présence de particules biotinylées ( $3.10^{11}$  particules.mL<sup>-1</sup>) pendant deux heures sur un agitateur rotatif.

Au moment de ces expériences nous ne disposions pas du dispositif expérimental avec le capillaire en verre afin d'observer la capture des particules. La capture est faite en agitant les billes d'alginate et les particules sur un agitateur de type « soleil ». Pour que la streptavidine et la biotine puissent interagir, les surfaces des billes et des particules doivent pouvoir se rapprocher suffisamment. La longueur de Debye dans le tampon utilisé est donc de 2 nm. Après observation au microscope nous constatons que les particules ne sont pas retenues à la surface des billes d'alginate.

La répartition de la fluorescence au niveau de la bille d'alginate en Figure 3-4 nous indique que le greffage de la streptavidine se fait dans l'ensemble de la bille, et pas seulement à la surface. Une minorité des streptavidines greffées est donc accessible pour interagir avec les particules biotinylées (qui contrairement à la biotine fluorescente, ne peuvent pas diffuser dans la bille). En considérant que

toute la streptavidine est greffée sur les billes, et que celles à la surface sont contenues dans une couronne d'épaisseur de 5nm (taille de la streptavidine), comme cela est représenté en Figure 3-6, la densité surfacique est estimée à 200 streptavidines. $\mu\text{m}^{-2}$ .

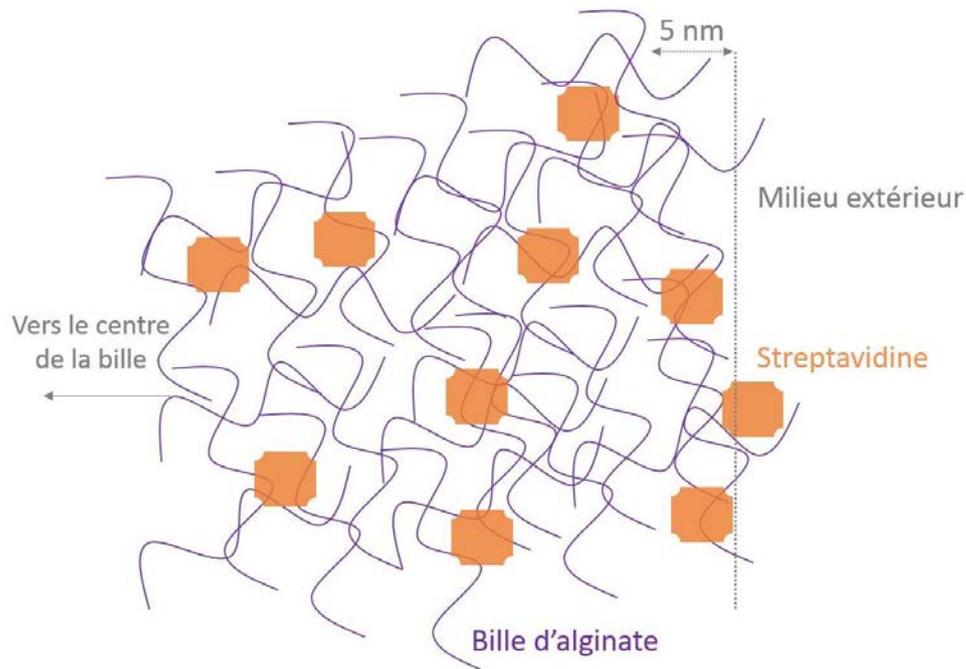
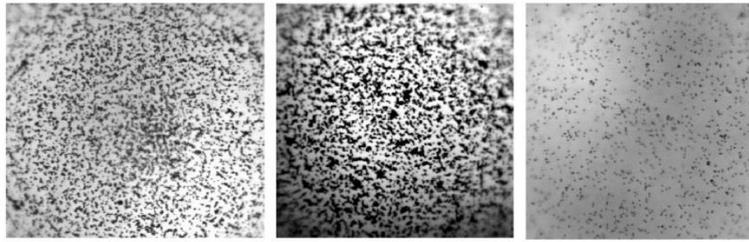


Figure 3-6 : Représentation schématique de la répartition des streptavidines greffées au sein d'une bille d'alginate. Les streptavidines contenues dans la couronne externe de 5nm d'épaisseur sont considérées comme accessibles pour interagir avec les particules. Au maximum la densité surfacique est de l'ordre de 200 streptavidines. $\mu\text{m}^{-2}$ .

Lorsqu'une particule de  $1\mu\text{m}$  de diamètre approche de la surface elle peut au maximum interagir avec 84 streptavidines (nombre de streptavidines contenues dans la surface projetée d'une particule) si toute la streptavidine est greffée aux billes d'alginate. Cependant toute la streptavidine ne réagit pas avec les billes (lorsqu'on greffe de la streptavidine fluorescente on constate qu'à la fin de la réaction le milieu réactionnel est toujours fluorescent). Vu les ordres de grandeurs ci-dessus, il est possible que le nombre de streptavidines à la surface des billes soit limitant pour former un lien avec les particules. Afin d'augmenter la quantité de streptavidines greffées sur les billes nous avons multiplié la concentration en streptavidine par 10, ce qui correspond à une concentration de  $20\mu\text{M}$ . Ensuite les billes d'alginate ont été mises en présence de particules micrométriques fonctionnalisées avec de la biotine ( $3.10^{11}$  particules. $\text{mL}^{-1}$ ) pendant deux heures. Le résultat de l'expérience est montré en Figure 3-7, sur l'image de gauche.



Particules de 1  $\mu\text{m}$  à la surface des billes d'alginate

Figure 3-7 : Surface de bille d'alginate observée en microscopie optique. Les points noirs sont des particules de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre fonctionnalisées avec de la biotine se trouvant à la surface des billes. A gauche la bille d'alginate a été préalablement fonctionnalisée avec de la streptavidine (20 $\mu\text{M}$ ), contrairement à la bille de droite (expérience témoin). Au centre, la bille d'alginate a été fonctionnalisée avec de la streptavidine (20 $\mu\text{M}$ ) préalablement polymérisée avec des brins de polyéthylène glycol (10<sup>4</sup> Da) avec 4 extrémités amines. Chaque lot de billes a été mélangé à une solution contenant des particules micrométriques biotinylées pendant 2 heures. Les billes sont observées à l'issue de cette phase de capture. Il y a plus de particules biotinylées à la surface des billes fonctionnalisées avec de la streptavidine (gauche et centre) qu'à la surface de la bille non fonctionnalisée (droite). Lorsque les billes sont greffées avec de la streptavidine préalablement polymérisée le nombre de particules capturées est encore plus important.

Nous constatons sur la Figure 3-7 qu'il y a plus de particules biotinylées à la surface de la bille fonctionnalisée avec de la streptavidine (image de gauche) qu'à la surface de la bille non fonctionnalisée (image de droite). L'augmentation de la concentration en streptavidines lors de l'étape de greffage permet de capturer spécifiquement des particules à la surface des billes. Cela confirme notre hypothèse : le nombre de streptavidines greffées est limitant pour la capture des particules.

Le problème est que la streptavidine est un produit qui coûte cher. Dans les expériences présentées ci-dessus un petit nombre de billes sont greffées, le coût est donc acceptable. Cependant remplir un capillaire (0,2 x 0,2 x 2 cm) avec des billes d'alginate greffées dans un milieu contenant de la streptavidine à 20  $\mu\text{M}$  coûterait plus de 2000 euros. Nous avons donc réfléchi à des moyens pour augmenter la quantité de streptavidine à la surface des billes sans augmenter la concentration en streptavidines introduite initialement. Pour cela nous avons remplacé les billes d'alginate par :

- des capsules d'alginate, c'est-à-dire des sphères composées d'une coque de gel d'alginate et contenant un cœur huileux dans lequel la streptavidine ne peut pas diffuser
- des billes d'alginate trempées dans l'éthanol ou séchées à l'étuve. En effet ces deux traitements entraînent une diminution de la taille des billes<sup>7</sup>, ce qui pourrait engendrer une diminution de la taille des pores.

Cependant aucune de ces voies n'a montré de résultats encourageants.

La dernière piste que nous avons explorée pour limiter la diffusion de la streptavidine dans les billes est représentée en Figure 3-8. Dans un premier temps la streptavidine est mise en présence de polyéthylène glycol de  $10^4$  Da avec quatre terminaisons amines, le PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, d'EDC et de s-NHS. Durant cette étape les PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> et les molécules de streptavidines vont réagir via la formation de liaisons amides. Cela entraîne la formation d'un réseau de streptavidines et de PEG. La streptavidine a une taille de l'ordre de 5 à 10 nm. Sachant que l'ordre de grandeur de la taille des pores du gel d'alginate est 16 nm, lorsque quelques PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> et streptavidines sont associés cela suffit à limiter la diffusion de la streptavidine dans la bille. Ensuite les billes d'alginate sont ajoutées au milieu réactionnel afin de se lier avec la streptavidine.

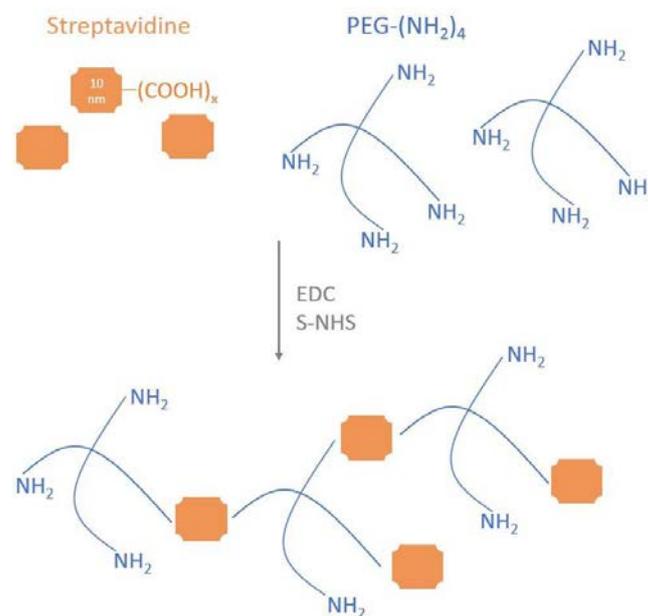


Figure 3-8 : Représentation schématique de la réaction ayant lieu entre des PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> de 10 kDa et des streptavidines en présence d'EDC et de s-NHS. Les streptavidines portent plusieurs fonctions acides carboxyliques et peuvent donc former un réseau en réagissant avec les PEG.

Le résultat de la capture de particules biotinylées pendant deux heures est montré en Figure 3-7 sur l'image de droite. Il y a plus de particules à la surface des billes fonctionnalisées avec de la streptavidine polymérisée que sur les billes fonctionnalisées avec de la streptavidine seule.

Afin d'être sûr qu'on observe une augmentation de la capture spécifique il faut vérifier un point. Sur les images en Figure 3-7 l'augmentation du nombre de particules n'est pas homogène sur la surface des billes. Sur la bille non fonctionnalisée (à droite) les particules sont réparties de manière homogène, par contre sur l'image au centre on constate que les particules sont agrégées à certains endroits. Cela pourrait être dû à la présence de streptavidines libres en solution. En effet après l'étape de greffage les billes d'alginate sont lavées afin d'éliminer les streptavidines libres, en particulier celles qui ont diffusé dans la bille. Cependant il en reste toujours une faible quantité qui pourrait agréger les

particules entre elles. Dans ce cas la différence observée entre les billes témoins et les billes greffées avec de la streptavidine pourrait être due au fait que dans un cas les particules sont capturées seules, et dans l'autre elles sont capturées sous forme d'agrégats. C'est un point à élucider par la suite.

L'augmentation de la quantité de streptavidines lors de l'étape de greffage a permis de capturer spécifiquement des particules biotinylées. Cependant la quantité de streptavidines utilisée est encore trop importante pour greffer un nombre suffisant de billes afin de faire une expérience de chromatographie de cellules (c'est-à-dire remplir un capillaire de 0,2 x 0,2 x 4 cm).

En conclusion, le greffage de la streptavidine sur les billes d'alginate n'est pas suffisamment au point pour nous permettre de réaliser des expériences de chromatographie d'affinité avec des cellules. Nous avons donc décidé de changer de système. Lors du greffage de la streptavidine il nous est apparu que la quantité de streptavidines greffées était le paramètre limitant à cause du prix de la streptavidine et du fait qu'elle diffuse dans les billes. Nous avons donc choisi deux systèmes nous permettant de nous affranchir de ces limitations :

- les billes d'alginate sont greffées avec de la biotine qui est un produit moins cher (410 euros pour 100  $\mu$ mole de biotines, 550 euros pour 0,2  $\mu$ mole de streptavidines).
- la streptavidine est greffée sur des billes de verre. Les billes étant solides la streptavidine ne peut pas diffuser à l'intérieur.

### 3.1.3. Augmentation de la densité surfacique de fonctionnalisation

#### 3.1.3.1. Le greffage de biotine sur des billes d'alginate

La biotine utilisée pour le greffage possède une extrémité amine. La réaction de greffage sur les billes d'alginate est donc identique à celle utilisée pour la streptavidine. Nous avons réalisé deux expériences, une où la concentration en biotines est identique à la concentration en streptavidines, 2  $\mu$ M, et une où la concentration en biotine est de 2 mM. Les quantités d'EDC et de s-NHS sont identiques à celles utilisées pour la streptavidine (respectivement 20mM et 10mM). Les billes d'alginate sont ensuite mises en présence de particules micrométriques fonctionnalisées avec de la streptavidine ( $3 \cdot 10^8$  particules.mL<sup>-1</sup>) pendant deux heures. Le principe est représenté en Figure 3-9.

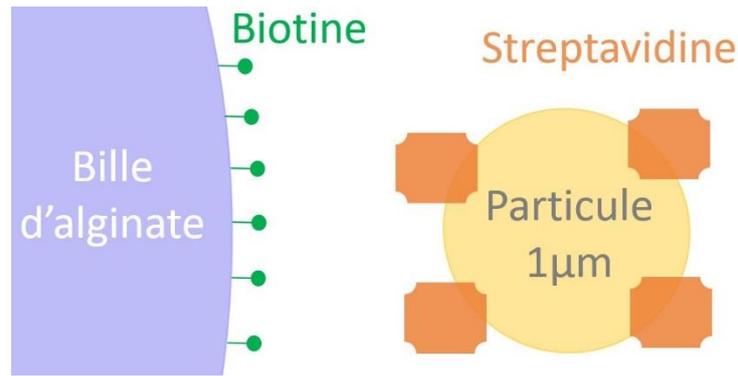


Figure 3-9 : Représentation schématique du principe de l'expérience permettant de tester la réactivité de la biotine greffée sur les billes d'alginate. Les billes d'alginate sont mises en présence de particules couvertes de streptavidines ( $3.10^{11}$  particules.mL<sup>-1</sup>) pendant deux heures sur un agitateur rotatif.

Les billes sont ensuite observées en microscopie optique. Les résultats sont représentés en Figure 3-10.

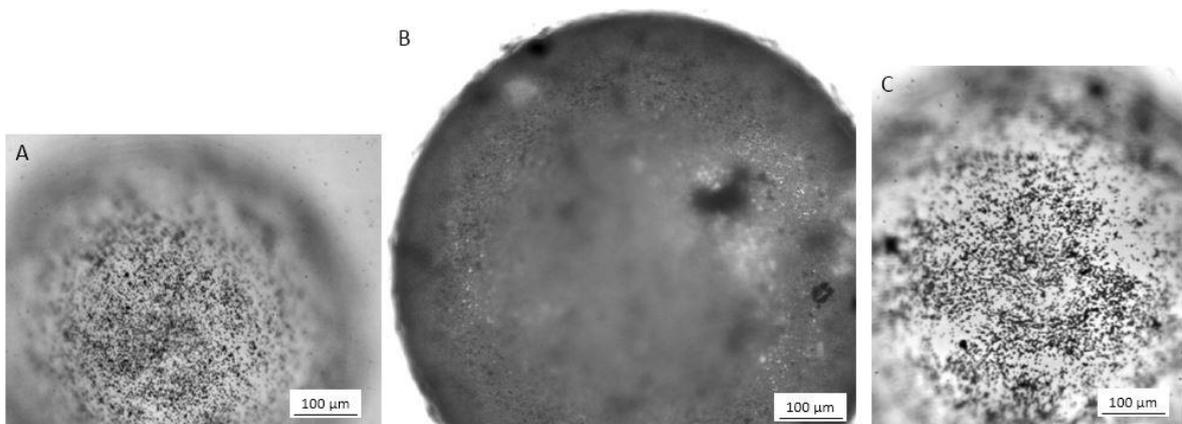


Figure 3-10 : Billes d'alginate fonctionnalisées avec de la biotine observées en microscopie optique. Elles sont mélangées avec des particules micrométriques recouvertes de streptavidines pendant 2 heures. En A la bille a été greffée avec de la biotine à 2 µM, en B à 2 mM, et en C sans biotine. Les points noirs sont les particules retenues à la surface des billes. Les billes greffées sans biotine ou avec 2 µM de biotines capturent la même quantité de particules, contrairement à la bille greffée avec 2 mM qui est totalement recouverte de particules.

Lorsque les billes sont greffées avec 2 µM de biotine (A) le nombre de particules retenues est identique au nombre de particules retenues à la surface des billes contrôles sans biotine (C). La capture spécifique sur ces billes (s'il y en a) est négligeable par rapport à la capture non spécifique. Par contre lorsque les billes sont greffées à une concentration de 2 mM en biotines, la capture spécifique de particules est importante. Les billes d'alginate semblent totalement couvertes de particules, et cela est confirmé lorsqu'on observe la surface des billes à un grossissement x 100, comme cela est montré en Figure 3-11.

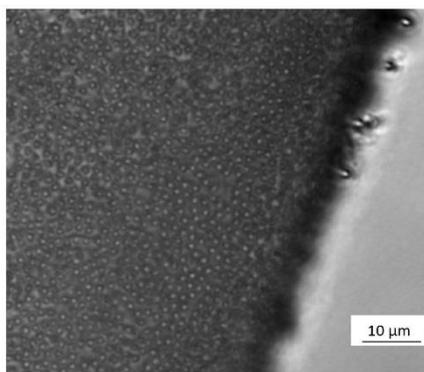


Figure 3-11 : Surface d'une bille d'alginate greffée avec de la biotine à 2 mM puis mise en présence de particules micrométriques recouvertes de streptavidines observée en microscopie optique. Les petites sphères sont les particules retenues à la surface de la bille. Elles forment une monocouche compacte.

En conclusion lorsque de la biotine ou de la streptavidine sont greffées sur des billes d'alginate à une concentration de 2  $\mu$ M, la capture spécifique de particules micrométriques est trop faible pour être détectée. Plus on augmente la quantité de molécules greffées, plus le nombre de particules capturées augmente.

Le protocole de greffage avec de la biotine à 2 mM permet d'obtenir des billes qui ont une réactivité suffisante pour capturer spécifiquement des particules micrométriques dans un temps raisonnable (dans le cadre du tri cellulaire). Afin d'utiliser cette solution pour capturer des cellules plusieurs voies sont possibles :

- Greffer de la streptavidine sur les cellules
- Marquer les cellules avec des anticorps biotinylés. Puis dans un second temps ajouter de la streptavidine afin qu'elle puisse relier les billes d'alginate biotinylées et les cellules marquées avec les anticorps biotinylés.

Cependant aucune de ces voies n'a donné de résultats assez satisfaisants pour étudier la capture spécifique.

Je vais maintenant présenter les résultats obtenus avec les billes de verre.

### 3.1.3.2. Le greffage de la streptavidine sur les billes de verre

Le principe du greffage du verre repose sur les étapes suivantes. Dans un premier temps les billes sont lavées afin de rendre les silanols en surface réactifs. Ensuite elles sont plongées dans une solution contenant un silane possédant une extrémité amine, nous avons utilisé de l'APTES ((3-Aminopropyl)triéthoxysilane). Le silanol du verre forme une liaison covalente avec l'extrémité silane de l'APTES. Les billes sont alors couvertes à leur surface de fonctions amines. En présence d'EDC et de s-NHS les fonctions acides carboxyliques de la streptavidine peuvent donc former une liaison amide

avec les billes de verre. La concentration en streptavidines lors du greffage est identique à la concentration minimale utilisée dans le protocole de greffage des billes d'alginate,  $2 \mu\text{M}$ . Les billes sont ensuite mises en présence de particules biotinylées. Pour la capture des particules nous avons été confrontés à un problème d'agitation. En effet les billes de verre sont lourdes et solides, si elles sont agitées dans un vortex ou sur un soleil les chocs sont trop importants et les particules capturées sont arrachées. Par contre le dispositif expérimental permettant de faire circuler les particules dans un empilement de billes contenu dans un capillaire étant au point nous l'avons utilisé. Le capillaire en verre est rempli avec les billes de verre fonctionnalisées ou non (cf. Figure 3-12). Puis une solution de particules biotinylées ( $1.10^{12}$  particules. $\text{mL}^{-1}$ ) circule dans le capillaire à une vitesse de  $0,3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  pendant une heure. Les capillaires sont ensuite rincés avec du tampon.

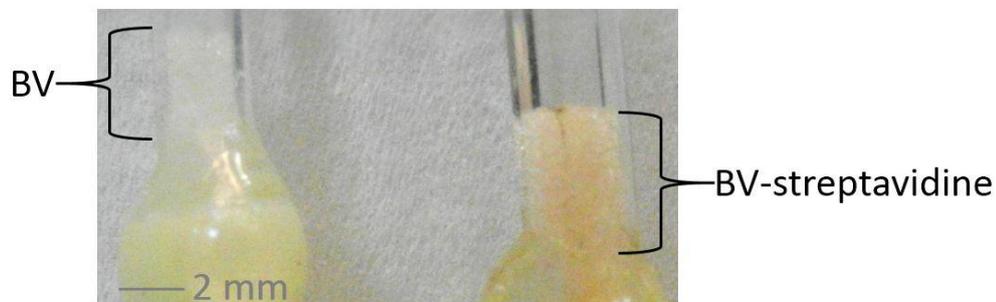


Figure 3-12 : Photographie de capillaires remplis de billes de verre. Le capillaire à droite est rempli de billes fonctionnalisées avec de la streptavidine, le capillaire à gauche est rempli de billes non fonctionnalisées. Une solution de particules micrométriques biotinylées a circulé dans les deux capillaires. Les billes dans le capillaire de droite sont plus marrons que celles dans le capillaire de gauche. Cela indique que les billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine ont retenu plus de particules que celles non fonctionnalisées. Les billes de verre fonctionnalisées avec de la biotine capturent spécifiquement les particules micrométriques biotinylées.

Initialement l'empilement de billes dans les deux colonnes est blanc. Après le passage de la solution de particules on constate que les billes greffées avec de la streptavidine deviennent marron. Cela est dû à la présence de particules. Par contre les billes non fonctionnalisées restent blanches. Les billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine à  $2 \mu\text{M}$  capturent spécifiquement des particules biotinylées.

Il n'est pas possible de comparer cette expérience avec celles réalisées avec les billes d'alginate car l'étape de capture se fait dans une géométrie différente et avec une concentration en particules différente, mais la conclusion est que ce protocole permet de produire des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine et capables de capturer des particules micrométriques biotinylées. La quantité de streptavidines nécessaire pour le greffage des billes de verre permet d'en produire un nombre suffisant pour faire une expérience de chromatographie cellulaire avec un coût raisonnable.

### 3.1.4. Conclusion

L'objectif de cette partie pendant ma thèse était de développer des billes réactives pour réaliser des expériences de chromatographie cellulaire. A priori cette étape ne nous semblait pas limitante, en réalité nous avons rencontré beaucoup d'obstacles. Nous avons exploré de nombreuses pistes afin de voir lesquelles pouvaient être prometteuses. Finalement les protocoles de greffage des billes d'alginate n'étaient pas assez au point pour continuer notre étude sur la capture spécifique en chromatographie. Nous avons donc choisi d'utiliser les billes de verre. Cependant cette solution n'est pas adaptée dans le cadre d'une application thérapeutique. Notamment car des petits bouts de verre pourraient être injectés chez les patients.

Je vais maintenant présenter l'étude menée sur la capture spécifique.

## 3.2. La capture spécifique

Notre objectif est à présent de quantifier la cinétique d'association dans le cadre d'une interaction spécifique. Pour cela nous avons étudié la capture de cellules, des globules rouges, par des billes de verre via une interaction streptavidine-biotine.

### 3.2.1. Le système étudié

L'objectif de cette partie n'est pas de mettre au point un tri cellulaire efficace en termes de rendement, de durée... mais d'étudier les mécanismes en jeu. Nous souhaitons quantifier la même grandeur que dans le chapitre précédent, une constante cinétique d'association, mais dans le cadre d'une interaction spécifique. Nous avons donc utilisé le même dispositif expérimental : une colonne remplie de billes mais cette fois-ci fonctionnalisées avec un ligand, et une solution contenant des cellules à la surface desquelles se trouvent des récepteurs, qui s'écoule dans la colonne. En utilisant des cellules plutôt que des particules comme dans le chapitre précédent le système étudié est plus représentatif du système réel.

Afin de quantifier la capture par observation de la colonne il est nécessaire de marquer les cellules, avec par exemple une molécule fluorescente comme le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) qui se fixe à l'ADN. Mais cela nécessite de mettre en place un nouveau montage permettant de mesurer la fluorescence dans la colonne au cours du temps. De plus les molécules fluorescentes subissent des phénomènes de photoblanchiment ce qui va limiter la durée des expériences. Nous avons donc eu l'idée d'utiliser des cellules marquées naturellement : les globules rouges (ou érythrocytes) qui sont rouges. De plus ces cellules sont présentes en grande quantité dans un échantillon sanguin, un millilitre de sang contient  $5.10^9$  érythrocytes. Et il n'est pas nécessaire de les purifier avant de les utiliser, en

travaillant avec du sang total on dispose d'un échantillon pur à 95% en érythrocytes. Nous avons travaillé avec des globules rouges humains issus de prélèvements sanguins de donneurs sains.

Nous avons considéré trois solutions, représentées en Figure 3-13, pour capturer les globules rouges sur les billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine.

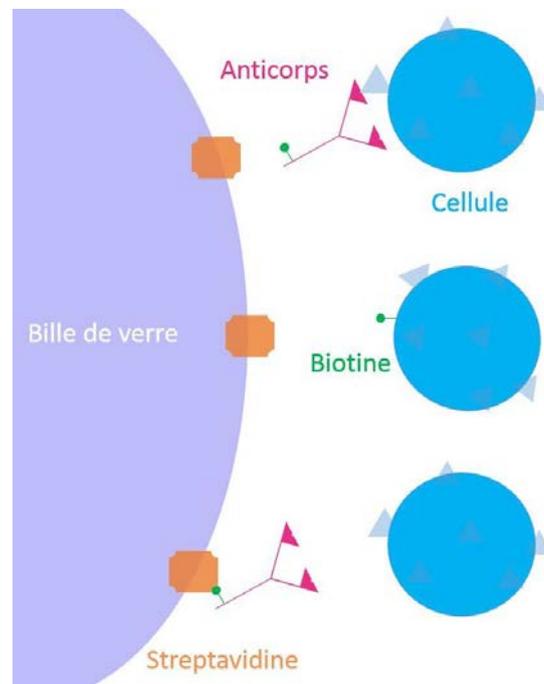


Figure 3-13 : Représentation schématique des trois stratégies que nous avons envisagées pour capturer spécifiquement des cellules sur des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine. En haut les cellules sont marquées avec des anticorps biotinylés, au milieu les cellules sont greffées de manière covalente avec de la biotine, et en bas l'anticorps biotinylé est fixé à la bille de verre.

Les solutions consistant à utiliser des anticorps biotinylés (haut et bas) sont les plus pertinentes car pour l'application finale c'est de cette manière que les cellules seront capturées. Les anticorps utilisés pour marquer les globules rouges se fixent aux glycophorines A et B. Un globule rouge porte environ  $2 \cdot 10^5$  glycoprotéines B dont le rôle n'est pas élucidé, et  $1 \cdot 10^6$  glycoprotéines A qui est une protéine chaperon<sup>8</sup>. On peut se demander : est ce qu'il est plus optimal de mettre l'anticorps sur les billes ou sur les cellules ? La rencontre initiale entre l'anticorps et la bille ou la cellule est efficace grâce au mouvement brownien de l'anticorps. Par contre la rencontre entre la cellule et la bille est beaucoup plus lente. Il paraît logique que le couple ayant la plus grande constante d'association en solution soit en jeu pour la capture la plus lente d'un point de vue du transport. La biotine et la streptavidine ont une constante d'association<sup>9</sup> de  $5 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Selon la constante d'association du couple anticorps antigène utilisé (si elle est connue) on peut décider quelle solution est optimale. Dans un premier temps nous avons décidé d'adopter la solution représentée en haut en Figure 3-13. Cependant le protocole de marquage des cellules avec les anticorps a dû être optimisé afin de limiter des phénomènes d'agrégation entre les globules rouges. C'est pour cela qu'en parallèle nous avons

développé un protocole de greffage covalent de la biotine sur les cellules. Et c'est donc la solution représentée au milieu en Figure 3-13 que nous avons mise en place pour commencer.

Les billes utilisées pour la capture sont des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine. Ces billes sont différentes des billes d'alginate, cependant cela ne change pas a priori le raisonnement que nous avons eu dans le chapitre précédent concernant l'étape de transport. En effet la seule caractéristique à considérer est la taille des billes. Cela est vrai tant que les interactions électrostatiques ont une portée de l'ordre du nanomètre et n'interviennent donc pas dans le transport. Dans notre cas la longueur de Debye est de 0,6 nm car la concentration en sel dans le tampon utilisé est de l'ordre de 300 mM afin de respecter la pression osmotique des cellules. Il a été montré que la cinétique de formation du lien streptavidine-biotine dépend de la manière dont les molécules sont greffées à la surface<sup>10</sup>. Le verre est une surface solide, moins dynamique que le gel d'alginate, donc la cinétique d'interaction peut être ralentie dans le cas de l'utilisation des billes de verre. Pour limiter cet effet une solution est de greffer les molécules sur les billes de verre via une « spacer », c'est-à-dire une chaîne permettant de conférer des degrés de liberté à la molécule greffée. Les expériences ont été réalisées avec une chaîne de 3 carbones séparant la streptavidine de la surface de la bille. Cela ne confère pas une grande dynamique à la streptavidine mais au moment de la réalisation des expériences nous ne disposons pas d'un protocole de greffage avec une chaîne plus longue. Nous gardons donc à l'esprit que sur cet aspect les billes de verre sont différentes des billes d'alginate. Nous avons choisi des billes ayant un diamètre compris entre 125 et 225µm.

Je vais maintenant présenter le dispositif expérimental et la méthode de quantification de la capture des globules rouges.

### 3.2.2. Montage expérimental et quantification de la cinétique de capture

Le montage expérimental consiste en une colonne telle que celle représentée en Figure 2-5, dans laquelle une solution de globules rouges circule. Les globules rouges absorbent la lumière, nous allons donc mesurer la quantité de lumière transmise. Cependant l'empilement de billes de verre entraîne un grand nombre de réflexions lumineuses, nous ne pouvons donc pas l'éclairer par derrière comme pour une mesure classique de DO. Nous éclairons donc notre système par le haut. Par conséquent le trajet optique n'est pas la taille du capillaire. Nous avons donc dû faire une courbe d'étalonnage reliant la concentration à la mesure de DO telle que définie dans l'équation (3-1).

$$DO = \log\left(\frac{I_0 - I_N}{I - I_N}\right) \quad (3-1)$$

Les différentes intensités sont définies de la manière suivante :

- $I_0$  est l'intensité lumineuse lorsque le capillaire est rempli avec du tampon
- $I_N$  est l'intensité lumineuse sans éclairage (on prend une photo avec le cache sur l'objectif)
- $I$  est l'intensité lumineuse pendant que la solution de globules rouges circule.

La Figure 3-14 montre les colonnes remplies avec des solutions de globules rouges à différentes concentrations. Les billes de verre ne sont pas fonctionnalisées. Un fond blanc est placé derrière les colonnes et elles sont éclairées en lumière blanche par une lampe placée au-dessus.

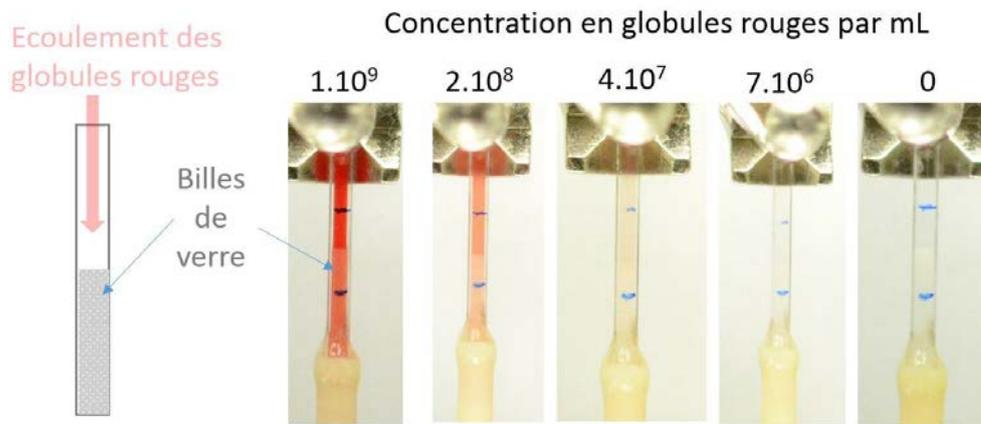


Figure 3-14 : Photographies d'une colonne remplie avec des billes de verre non fonctionnalisées et contenant une solution de globules rouges à différentes concentrations comprises entre 0 et  $1.10^9$  globules rouges. $\text{mL}^{-1}$ . Les traits bleus sont des graduations, la distance entre les 2 traits est de 1 cm.

Les images sont prises avec un appareil photo numérique Nikon D700. Les réglages sont les suivants : ouverture  $f/4.2$ , vitesse d'obturation  $1/4000$  et Iso : 2,1. A partir de ces images nous pouvons mesurer l'intensité lumineuse reçue dans le vert, le bleu et le rouge (selon le codage RGB). Les intensités  $I_0$  et  $I$  sont mesurées en amont des billes, et au niveau des billes. Nous pouvons calculer la DO pour chaque signal reçu dans le vert, le bleu ou le rouge. A partir des mesures réalisées dans le vert et le bleu la concentration en globules rouges  $C_{\text{GRT}}$  est reliée linéairement à la mesure de DO :

$$DO_{\text{Vert}} = G_{\text{Vert}} * C_{\text{GRT}} \quad (3-2)$$

$$DO_{\text{Bleu}} = G_{\text{Bleu}} * C_{\text{GRT}} \quad (3-3)$$

Par contre le signal reçu dans le rouge saturé, nous ne pouvons donc pas déterminer le coefficient  $G_{\text{Rouge}}$  reliant la concentration à la  $DO_{\text{Rouge}}$ .

Lorsque la mesure est faite en amont des billes  $C_{\text{GRT}}$  correspond à la concentration en globules rouges en solution. Pour la mesure réalisée au niveau des billes, cette concentration est la somme de la

concentration en globules rouges libres  $C_{GRL}$  et des globules rouges capturés  $C_{GRC}$ . La courbe d'étalonnage en Figure 3-15 représente  $DO_{Vert}$  en fonction de la concentration en globules rouges.

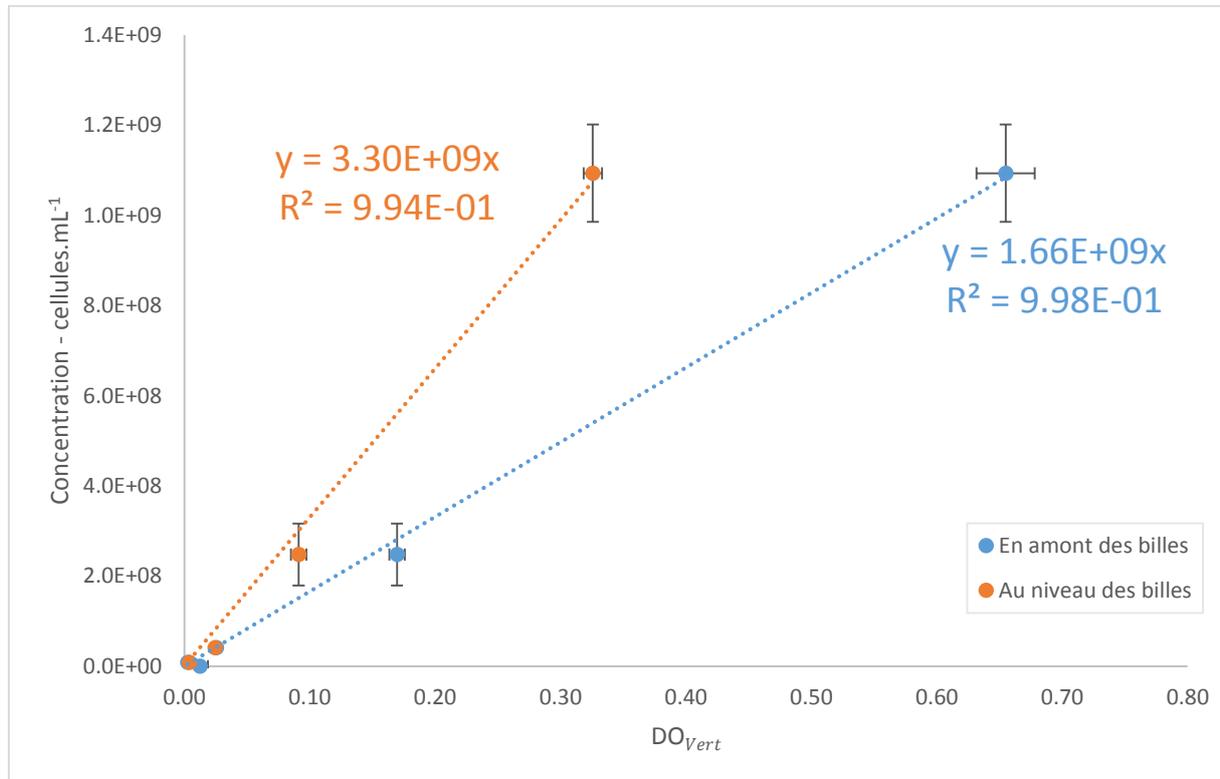


Figure 3-15 : Graphique représentant la concentration en globules rouges en fonction de la mesure de  $DO_{Vert}$ . Les mesures d'intensité sont réalisées en amont des billes et dans l'empilement de billes. Les concentrations en cellules ont été mesurées en cellule de Malassez. Les mesures sont faites trois fois. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Cette courbe d'étalonnage n'est valable que pour des images prises avec le même appareil photo et dans les mêmes conditions de prises de vue.

Le raisonnement permettant de remonter à la constante cinétique d'association est identique à celui que nous avons présenté dans le chapitre précédent. Dans le cas où :

- la concentration en globules rouges libres est en régime stationnaire
- le taux de dissociation est négligeable par rapport au taux d'association
- dans la zone de mesure, la concentration en particules libres est gouvernée par la convection et la capture est négligeable, de manière à approximer  $C_{GRL}$  par  $C_{GRL0}$
- la surface occupée par les globules rouges capturés est négligeable par rapport à la surface totale de bille, nous pouvons écrire :

$$\frac{\partial C_{GRT}}{\partial t} = k_{on} * C_{GRL0} \quad (3-4)$$

Avec  $C_{GRL0}$  la concentration en amont des billes.

L'expérience est conçue pour que les hypothèses ci-dessus soient vérifiées et à posteriori nous le confirmons (données présentées en annexe).

Je vais présenter les résultats que nous avons obtenus avec ce dispositif expérimental.

### 3.2.3. Résultats et interprétation

#### 3.2.3.1. Le système modèle

La Figure 3-16, montre l'évolution de la colonne au cours d'une expérience de capture. Initialement la colonne est remplie de tampon. La solution de globules rouges circule dans la colonne. Les billes de verre deviennent de plus en plus rouges lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec de la streptavidine. Si on rince ensuite la colonne avec du tampon on constate que les billes de verre non fonctionnalisées sont blanches, comme au départ, alors que les billes fonctionnalisées avec de la streptavidine sont devenues rouges. La capture des globules rouges est donc bien spécifique.

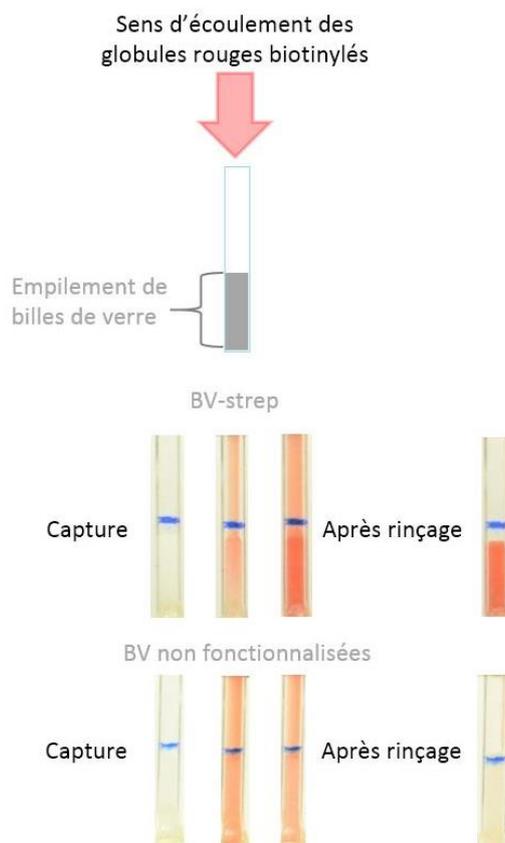


Figure 3-16 : Photographies de deux colonnes l'une contenant des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine (BV-strep) et l'autre contenant des billes de verre non fonctionnalisées pendant le passage d'une solution contenant  $8 \cdot 10^7$  globules rouges. $\text{mL}^{-1}$  à  $7 \cdot 10^{-4}$   $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . La hauteur de l'empilement est 1,5 cm. Le trait bleu est une graduation. Au départ les billes sont blanches, et après 12 minutes et le passage de  $1,5 \cdot 10^8$  globules rouges les billes sont rincées avec du tampon. On constate que les billes non fonctionnalisées sont blanches comme au départ, alors que les billes fonctionnalisées avec de la streptavidine sont rouges, ce qui indique qu'elles ont capturé des globules rouges ( $8 \cdot 10^8$  globules rouges. $\text{mL}^{-1}$ ).

Nous avons observé les billes au microscope après le rinçage. Les images sont montrées en Figure 3-17.

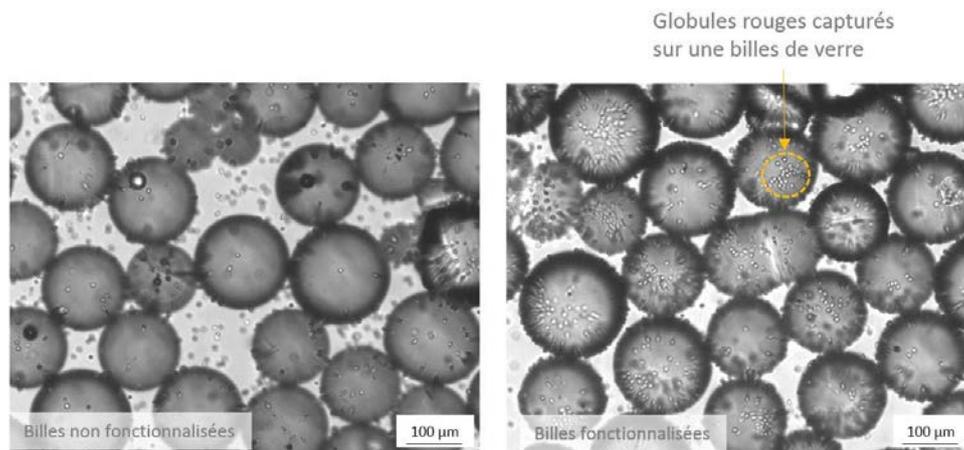


Figure 3-17 : Images de microscopie optique des billes de verre après le passage d'une solution contenant  $8.10^7$  globules rouges. $mL^{-1}$  à  $7.10^{-4}$   $m.s^{-1}$  pendant 12 minutes. Les billes sont ensuite rincées avec du tampon. Afin de les observer au microscope elles sont sorties de la colonne et mises dans un puits. On constate qu'il n'y aucune cellule à la surface des billes non fonctionnalisées. Par contre des globules rouges sont retenus sur les billes fonctionnalisées avec de la streptavidine.

Nous constatons que des globules rouges sont capturés sur les billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine. Par contre nous ne voyons pas de globules rouges à la surface des billes de verre non fonctionnalisées. La rétention des globules rouge est donc due à une interaction spécifique entre la streptavidine à la surface des billes et la biotine à la surface des cellules.

Nous avons étudié la capture spécifique des globules rouges à des vitesses différentes. La gamme de vitesses intéressante est comprise entre le  $10^{-6}$   $m.s^{-1}$  et  $10^{-2}$   $m.s^{-1}$  (cf. 2.1.1.3). Nous avons réalisé des expériences à  $4.10^{-4}$   $m.s^{-1}$ ,  $7.10^{-4}$   $m.s^{-1}$  et  $9.10^{-3}$   $m.s^{-1}$ .

La Figure 3-18 représente l'évolution temporelle de la concentration  $C_{GRT}$  dans l'empilement de billes et en amont des billes pour la vitesse d'écoulement de  $4.10^{-4}$   $m.s^{-1}$ .

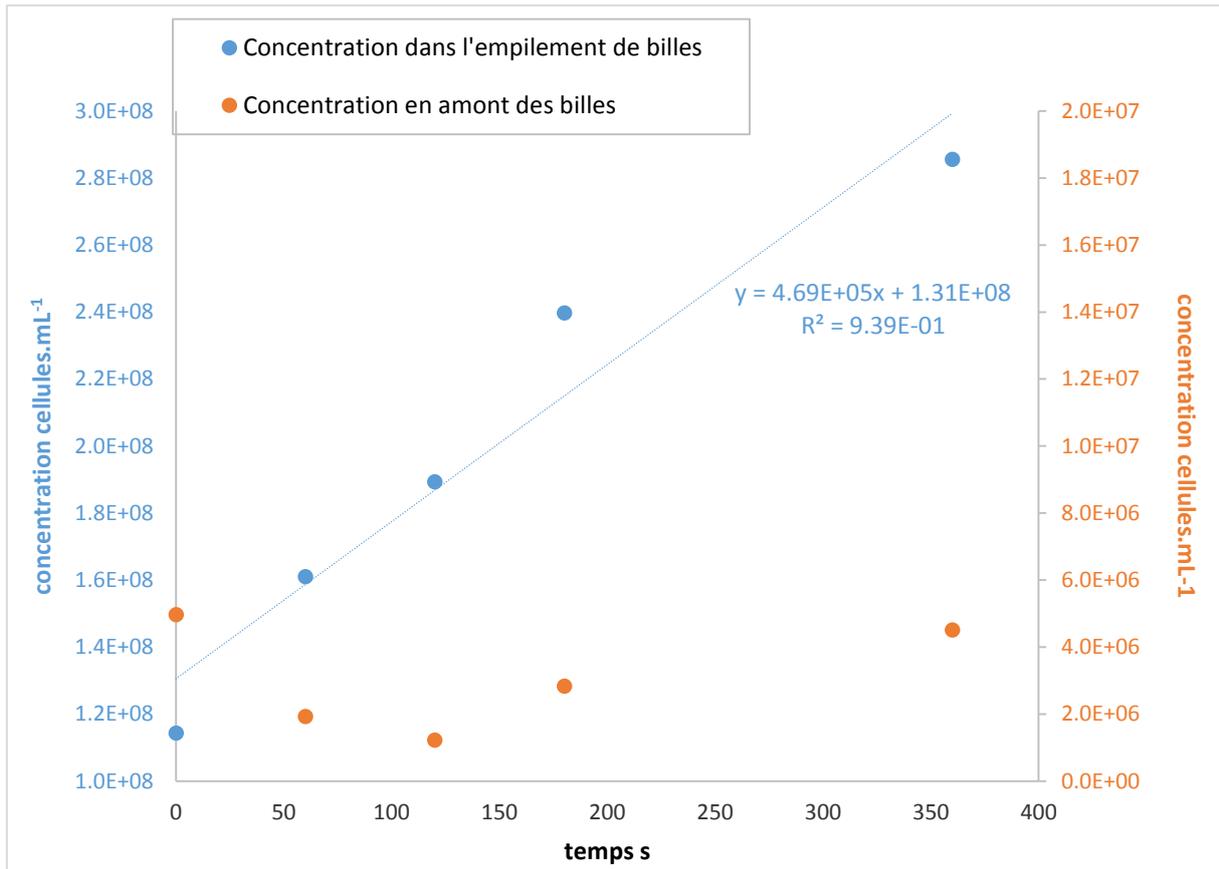


Figure 3-18 : Graphique représentant la concentration en globules rouges dans l'empilement de billes (courbe bleue, ordonnées à gauche) et en amont des billes (courbe orange, ordonnées à droite) lors du passage d'une solution de globules rouges dans un empilement de billes de verre. Les billes ont préalablement été fonctionnalisées avec de la streptavidine. La vitesse d'écoulement des globules rouges est  $4.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ . La courbe de régression linéaire de la concentration en globules rouges dans l'empilement de billes est représentée en pointillés bleus.

Nous constatons que la concentration en globules rouges dans l'empilement de billes évolue linéairement avec le temps. Cette évolution est due à la capture des globules rouges.

A la fin de la capture la colonne est rincée avec du tampon, nous pouvons alors mesurer la concentration en cellules capturées. Pour les trois vitesses la surface de billes occupée par les cellules capturées est autour de 30%. Contrairement à la capture de particules où la constante d'association diminue lorsque 3% de la surface est occupée, la constante d'association reste linéaire au moins jusqu'à 30% d'occupation des billes par les cellules. C'est un point positif pour la technique de tri finale, la contrainte sur la surface de billes nécessaire est moins importante que dans le cas de la capture des particules.

Sous certaines conditions (détaillées en annexe) nous pouvons déduire la constante d'association  $k_{on}$  à partir de l'évolution temporelle de  $C_{GRT}$  dans l'empilement de billes et en amont des billes (cf. équation (3-4)). Le graphique en Figure 3-19 représente les efficacités de capture expérimentales

déterminées à partir des mesures de constante d'association  $k_{on}$  (cf. équation (2-73)). Nous représentons en plus les valeurs théoriques selon le modèle de Tufenkji.

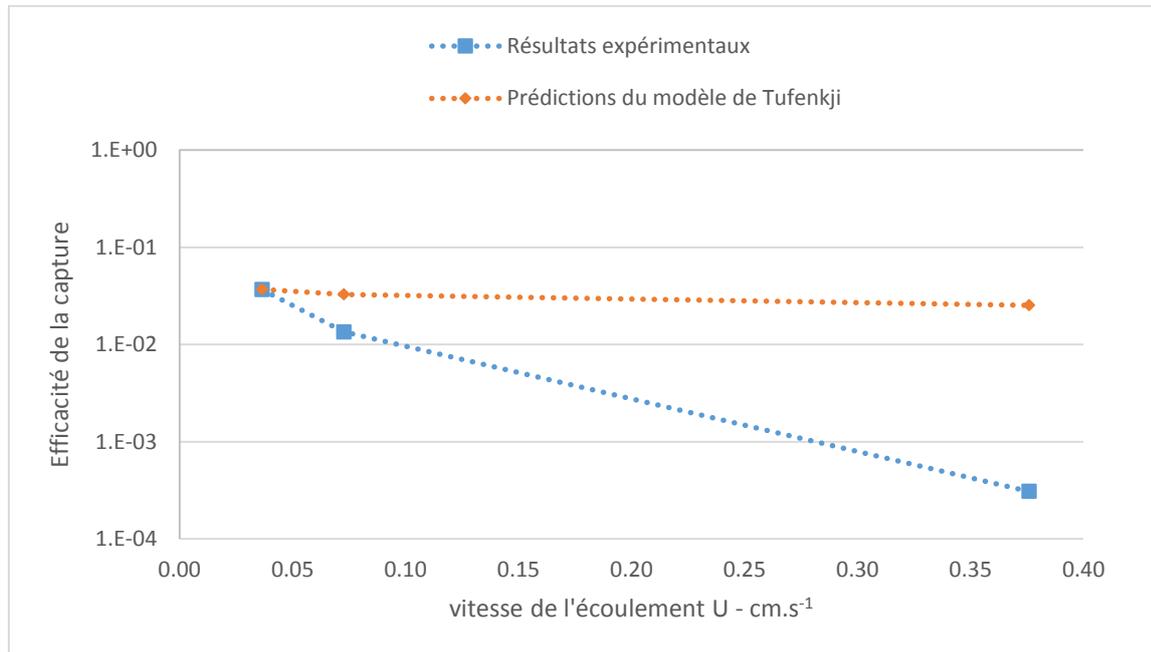


Figure 3-19 : Graphique représentant les efficacités de capture expérimentales déterminées à partir des mesures de constante d'association  $k_{on}$ , ainsi que les prédictions du modèle de Tufenkji. Le rayon des billes est  $150 \mu\text{m}$ , le rayon des cellules est  $4.10^{-6} \text{ m}$ , la température est  $298 \text{ K}$ , la viscosité est  $1.10^{-3} \text{ Pa.s}$ , la constante de Hamaker est  $2.10^{-20} \text{ J}$ , la masse volumique des particules est  $1,06.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , la masse volumique du fluide est  $1.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , et la porosité est  $0,4$ .

En parallèle nous avons réalisé des expériences contrôles pour les trois vitesses en utilisant des billes non greffées avec de la streptavidine. Nous constatons dans ce cas que  $C_{GRT} = C_{GRL}$ . Cela signifie que la constante d'association non spécifique est trop faible pour être mesurée. La constante d'association mesurée avec les billes fonctionnalisées est donc une mesure de la cinétique de formation de lien spécifique. Il est probable que plusieurs couples streptavidine-biotine se forment. On ne parle donc pas ici de la constante de formation d'une seule liaison spécifique entre la cellule et la bille, mais d'un lien spécifique global comprenant plusieurs couples permettant de retenir la cellule.

Ce sont les premières expériences que nous avons réalisées avec ce montage et les conditions expérimentales n'étaient pas optimales pour mesurer précisément la constante d'association. En particulier la concentration en globules rouges en amont des billes est à la limite de la gamme de concentration où notre courbe d'étalonnage est valide. Ces valeurs sont à considérer comme un ordre de grandeur des constantes d'association.

Sur la Figure 3-19 nous constatons que lorsque la vitesse est autour de  $5.10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$  le modèle de Tufenkji prédit l'ordre de grandeur de nos mesures expérimentales. Par contre lorsque la vitesse augmente et atteint  $3.10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$  les prédictions ne sont plus suffisantes pour expliquer la cinétique de

capture spécifique. Nous pouvons interpréter ça de la manière suivante : il existe un régime où la cinétique de capture est gouvernée par le transport des cellules à la surface des billes, et dès qu'une cellule atteint la surface elle est capturée. Lorsque la vitesse augmente la formation du lien devient cinétiquement importante. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Lorsque la vitesse de l'écoulement augmente la durée de la collision entre les cellules et les billes diminue. Cette durée peut devenir insuffisante pour qu'un lien spécifique se forme. Nous pouvons par exemple nous demander si cela joue principalement sur la formation du premier lien streptavidine-biotine ou sur la formation du nombre de liens suffisant pour maintenir la cellule à la surface de la bille.

Nous avons ensuite voulu tester l'influence de la densité surfacique en streptavidines. Les billes sont greffées avec de la streptavidine à une concentration entre 2  $\mu\text{M}$  et 200  $\mu\text{M}$ . Avec de la biotine fluorescente nous avons vérifié qualitativement que lorsqu'on augmente la quantité de streptavidines introduite pendant le greffage, la quantité de streptavidines greffées sur les billes augmente. Nous constatons que le signal de fluorescence est d'autant plus important que les billes ont été greffées avec une quantité importante de streptavidines. Nous réalisons ensuite des expériences de capture avec des globules rouges biotinylés. Dans toutes les colonnes le même nombre de globules rouges est passé à la même vitesse. Lors de ces expériences nous n'avons pas pu déterminer les constantes d'association car les concentrations des solutions de globules rouges étaient trop élevées. Et le système se trouve trop rapidement (pour que nous puissions effectuer la mesure) dans le régime où la surface de billes occupée par les globules rouges est importante. La Figure 3-20 représente les résultats de l'expérience après le rinçage des colonnes.

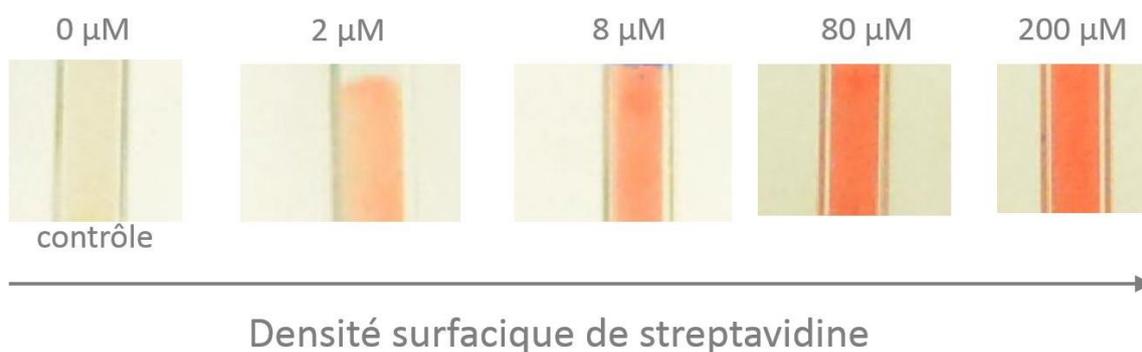


Figure 3-20 : Photographies de colonnes remplies avec des billes de verre, et dans lesquelles se sont écoulées des solutions contenant  $8 \cdot 10^7$  globules rouges. $\text{mL}^{-1}$  à  $7 \cdot 10^{-4}$   $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  pendant 12 minutes. Les colonnes ont ensuite été rincées avec du tampon. De gauche à droite les colonnes contiennent des billes de verre greffées avec une concentration croissante de streptavidines (indiquée au-dessus de chaque photographie)

Nous constatons que lorsque la densité surfacique de streptavidines augmente, la quantité de globules rouges capturés augmente.

Il est intéressant de noter qu'au cours des expériences montrées en Figure 3-20 en 10 minutes la quantité de cellules capturées est de l'ordre de  $10^7$  globules rouges. Avec une colonne de dimension de l'ordre du centimètre nous pouvons déjà capturer une quantité non négligeable de cellules. Lorsqu'on trie un sang cordon on récupère  $5.10^6$  CSH. Par contre les rendements de capture sont pour le moment de 10%. Cependant la surface de bille occupée par les cellules capturées est supérieure à 60% de la surface totale (pour les colonnes greffées à 80  $\mu$ M et 200  $\mu$ M) donc il est probable qu'elles soient saturées, et qu'on sous-estime le rendement. En effet à partir d'un certain moment, les globules rouges n'étaient surement plus capturés car la surface des billes était saturée.

A terme la capture se fera via un anticorps biotinyllé (cf. Figure 3-2) et non pas en greffant directement la biotine sur les cellules. Il est donc important de vérifier que la capture via un anticorps est possible et qu'elle est similaire au système étudié. En parallèle nous avons capturé des globules rouges via des anticorps biotinyllés.

### 3.2.3.2. La capture grâce aux anticorps

#### La capture spécifique des cellules

Au moment où nous avons réalisé les expériences avec les anticorps biotinyllés la méthode de quantification n'était pas au point. Les résultats présentés sont donc qualitatifs.

Nous avons effectué une expérience de capture avec des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine et des globules rouges incubés avec des anticorps anti - Glycophorine A+B biotinyllés pendant 30 minutes. La Figure 3-21 est une photographie de la colonne après plusieurs passages d'une solution contenant initialement  $9.10^6$  globules rouges. Une expérience témoin est réalisée avec des billes de verre non fonctionnalisées. Sur l'image de gauche ce sont les colonnes avant la capture. La colonne contenant les billes de verre fonctionnalisées (BV-strep) est rose car la streptavidine est fluorescente, alors que les billes de verre non fonctionnalisées (BV) sont blanches. Après le passage de  $9.10^6$  globules rouges, puis rinçage de la colonne, on constate que la colonne contenant les BV-strep est devenue rouge. Au contraire la colonne contenant les billes non fonctionnalisées est blanche comme avant la capture. Les billes des verres ont donc capturé spécifiquement les globules rouges via un anticorps biotinyllé.

On observe un gradient de la couleur rouge, la colonne est plus rouge en haut que en bas. Il y a un gradient de cellules capturées qui est lié au gradient de concentration en globules rouges libres pendant la capture. Nous distinguons ici la longueur caractéristique à partir de laquelle la concentration en globules rouges en solution diminue significativement par rapport à la concentration

en amont du fait de la capture. Avant, l'apport de globules rouges par l'écoulement contrebalance leur capture.

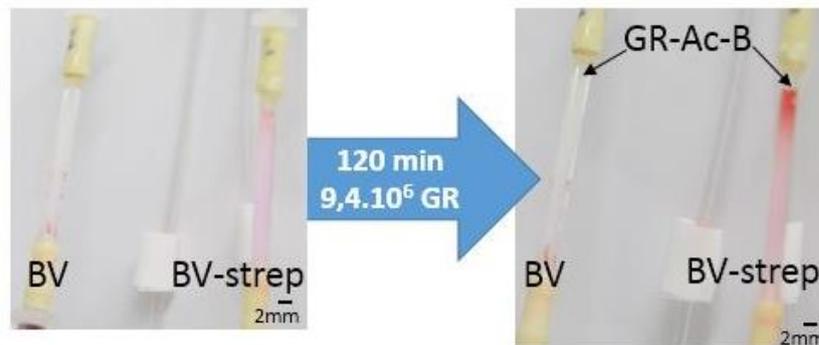


Figure 3-21 : Photographies de colonnes contenant des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine (BV-strep) ou non (BV), avant (image de gauche) et après (image de droite) le passage d'une solution de globules rouges marqués avec des anticorps biotinylés puis rinçage avec du tampon. La solution contient  $2.10^6$  globules rouges.mL<sup>-1</sup> qui circulent à une vitesse de  $3.10^{-4}$  m.s<sup>-1</sup>. Le rinçage est effectué à la même vitesse.

Afin de comparer cette interaction à celle en jeu lorsque la biotine est greffée directement à la cellule, nous avons réalisé deux expériences dans les mêmes conditions (vitesse, concentration, billes de verre) mais dans un cas les globules rouges sont greffés avec de la biotine (GR-B) et dans l'autre cas la biotine est fixée aux cellules via l'anticorps anti - Glycophorine A+B biotinylés (GR-Ac-B). La Figure 3-22 montre les colonnes avant la capture et après le rinçage.

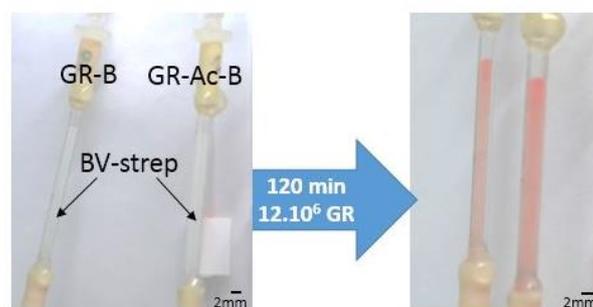


Figure 3-22 : Photographies de colonnes contenant des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine (BV-strep) avant (image de gauche) et après (image de droite) le passage d'une solution contenant  $3.10^6$  globules rouges.mL<sup>-1</sup> qui circulent à une vitesse de  $3.10^{-4}$  m.s<sup>-1</sup>. Dans un cas les globules rouges sont greffés avec de la biotine (GR-B), dans l'autre cas les globules rouges sont marqués avec des anticorps biotinylés (GR-Ac-B). Les colonnes sont ensuite rincées avec du tampon.

Nous constatons que les colonnes ont la même couleur rouge. C'est un résultat préliminaire nous indiquant que la cinétique de capture est similaire lorsque la biotine est greffée de manière covalente sur les cellules, ou bien lorsqu'elle est fixée via un anticorps. Notre système modèle est donc proche du système final de capture.

Jusqu'à présent nous nous sommes concentrés sur la capture des cellules. C'est le premier enjeu du tri cellulaire mais ce n'est pas le seul il faut ensuite être capable de les détacher des billes afin de les récupérer. Une solution envisageable est d'utiliser la force de l'écoulement pour les détacher des billes. Il est probable que le lien se brise là où l'interaction est la plus faible c'est-à-dire au niveau de la liaison anticorps antigène. Il n'est donc pas pertinent de tester le détachement des cellules lorsque la biotine est greffée de manière covalente sur les cellules. La capture via des anticorps fonctionnant nous nous sommes intéressés au détachement des cellules.

### Le détachement des cellules

L'intérêt de l'application d'une force mécanique est qu'aucun produit chimique n'est utilisé. Pour une application clinique cela est un réel avantage. Nous avons donc choisi de travailler sur la libération des cellules grâce à la force de cisaillement appliquée par l'écoulement sur les cellules.

Je vais vous présenter le résultat préliminaire que j'ai obtenu sur ce point. A ce moment-là le dispositif permettant de quantifier la concentration en globules rouges n'était pas au point. Le résultat présenté est donc qualitatif.

Afin d'étudier le détachement des cellules grâce à la force de cisaillement de l'écoulement nous avons réalisé la capture spécifique de globules rouges sur des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine. Les globules rouges sont marqués avec les anticorps anti - Glycophorine A+B biotinylés. Les cellules sont capturées à une vitesse de  $3 \cdot 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$  (vitesse dans le capillaire). Ensuite la colonne est rincée avec du tampon à la vitesse  $U$  de  $6 \cdot 10^{-1} \text{ m.s}^{-1}$ , c'est-à-dire  $1,5 \text{ m.s}^{-1}$  dans les pores, pendant 1 heure. Les résultats de l'expérience sont présentés en Figure 3-23.

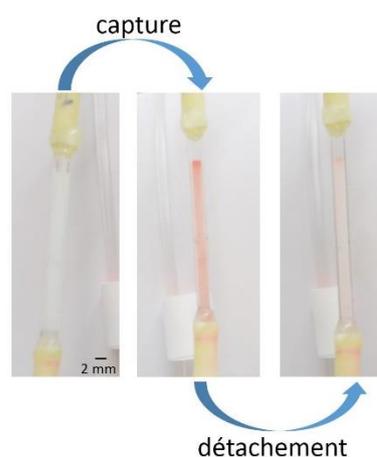


Figure 3-23 : Photographies d'une colonne contenant des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine. A gauche c'est la colonne initialement. Au milieu, une solution contenant  $3 \cdot 10^6$  globules rouges. $\text{mL}^{-1}$  marqués avec des anticorps biotinylés est passée dans la colonne à une vitesse de  $3 \cdot 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ . La colonne a ensuite été rincée à la même vitesse. A droite, la colonne a été rincée pendant 60 minutes avec du tampon circulant à une vitesse de  $6 \cdot 10^{-1} \text{ m.s}^{-1}$ .

Après la phase de capture les billes sont rouges, des globules rouges ont donc bien été capturés sur les cellules. Après la phase de détachement la colonne est moins rouge, des cellules ont donc été détachées des billes. La colonne n'est pas aussi blanche qu'au départ, donc il reste des globules rouges accrochés aux billes.

La vitesse utilisée pour détacher les cellules ci-dessus correspond à un cisaillement de  $30 \text{ N.m}^{-2}$  dans les pores. Ce cisaillement est relativement élevé par rapport au cisaillement en vigueur dans le flux sanguin, par exemple dans les capillaires le cisaillement atteint au maximum  $5 \text{ N.m}^{-2}$ .

Il est donc possible de détacher les globules rouges lorsqu'on applique un flux. Il faudra dans le futur s'intéresser au rendement de cette étape (c'est-à-dire la fraction de cellules libérées parmi les cellules capturées) ainsi qu'à la viabilité des cellules.

### 3.2.4. Conclusion

Dans cette partie nous avons étudié la cinétique de capture spécifique. Nous sommes toujours dans une démarche de comprendre ce qui régit la cinétique de capture lors de la chromatographie, nous ne sommes pas encore dans la mise au point d'une technique de tri performante pour une application donnée. Nous avons donc utilisé un système modèle, des globules rouges biotinylés et des billes de verre fonctionnalisées avec de la streptavidine, nous permettant d'étudier précisément la cinétique de capture spécifique. Nous avons adapté le dispositif expérimental développé au chapitre précédent, notamment grâce à l'utilisation des globules rouges dont on peut quantifier directement la capture sans aucun marquage préalable par fluorescence.

Pour le moment les expériences en sont encore à l'étape de mise au point, nous n'avons donc pas pu mesurer la cinétique d'association précisément. Cependant il semble que selon la vitesse de l'écoulement il y ait deux régimes. Dans le premier régime la cinétique de capture est dominée par le transport, et les cellules sont capturées dès qu'elles sont à proximité de la surface des billes. Puis lorsque la vitesse de l'écoulement augmente, la formation du lien devient limitante.

Il faut noter que le modèle de Tufenkji décrit le transport de particules solides et sphériques, or les globules rouges sont des cellules qui ont des propriétés physiques particulières comme leur forme biconcave, ou leur grande capacité à se déformer afin de circuler dans les capillaires sanguins. Leur mouvement dans un écoulement présente une dynamique particulière. Selon le cisaillement ils adoptent un mouvement de type « tumbling » ou « tank-treading »<sup>11</sup>. Il sera donc important de vérifier que la capture spécifique d'autres types cellulaires se comporte de la même manière.

Nous avons en parallèle commencé à étudier un système plus proche du système réel en utilisant des anticorps biotinylés. D'après les premiers résultats il semble qu'il n'y ait pas de différence significative

entre la capture de cellules greffées de manière covalente avec de la biotine, ou marquées avec des anticorps biotinylés. Cela confirme en partie la pertinence de notre modèle par rapport au système réel.

Maintenant que nous comprenons en partie ce qui régit la capture des cellules dans une colonne chromatographique, nous pouvons commencer à réfléchir aux conditions permettant à la chromatographie cellulaire de répondre aux contraintes d'une application donnée.

### 3.3. La chromatographie cellulaire pour une application médicale à grande échelle

Les performances d'une méthode de tri cellulaire sont mesurées sur les deux critères suivants le rendement et la pureté. La pureté est un aspect du tri que nous n'avons pas étudié lors de cette thèse nous nous sommes concentrés sur l'étude de la cinétique de capture qui détermine le rendement.

Dans un premier temps nous allons définir le rendement de capture d'une colonne chromatographique et l'exprimer en fonction de l'efficacité de capture, qui est le paramètre que nous avons étudié.

Nous considérons le système de tri dans son ensemble, c'est-à-dire une colonne de hauteur  $h$  et de section  $S$ , remplie de billes dans laquelle on fait s'écouler une suspension cellulaire de concentration initiale en cellules d'intérêt  $C_{CL0}$ .

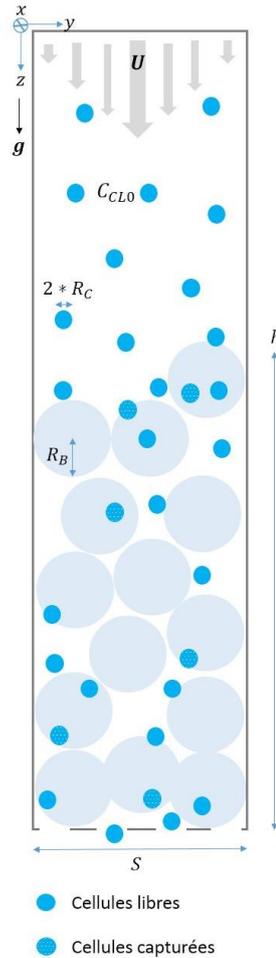


Figure 3-24 : Représentation schématique d'une colonne chromatographique de longueur  $h$  et de section  $S$ , permettant de trier les cellules par affinité. La colonne est remplie avec des billes de rayon  $R_B$  permettant la rétention spécifique des cellules. La suspension cellulaire s'écoule à la vitesse  $U$  dans la colonne, et contient des cellules d'intérêt à une concentration de  $C_{CL0}$ . Le rayon des cellules est  $R_C$ .

Nous allons calculer le rendement de capture dans le cas simple où la concentration en cellules libres est en régime stationnaire, les phénomènes de dissociation sont négligeables, et la surface de billes occupée est négligeable devant la surface libre. Nous nous plaçons donc dans le régime où la concentration en cellules libres s'exprime de la manière suivante (Cf. équation (2-20)) :

$$C_{CL}(z) = C_{CL0} * \exp\left(-\frac{k_{on}}{U_P} * z\right) \quad (3-5)$$

Le rendement de la capture est défini comme le nombre de cellules d'intérêt capturées dans la colonne  $N_C$  par rapport au nombre de cellules d'intérêt initialement présentes dans l'échantillon  $N_0$ .

$$r = \frac{N_C}{N_0} = 1 - \frac{C_{CL}(h)}{C_{CL0}} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{on}}{U_P} * h\right) \quad (3-6)$$

En fonction de l'efficacité de capture  $\eta$ :

$$r = 1 - \exp\left(-\frac{3*\phi}{4*R_B} * \eta * h\right) \quad (3-7)$$

Avec  $U_p$  la vitesse d'écoulement dans les pores de l'empilement de billes,  $R_B$  le rayon des billes et  $\phi$  la fraction volumique en billes. Nous nous plaçons dans la gamme de vitesses où la formation du lien n'est pas limitante. Nous calculons donc l'efficacité de capture  $\eta$  grâce aux prédictions de Tufenkji. Le rendement est une fonction de la vitesse  $U$ , de la taille des billes, et de la longueur de la colonne :  $r(U, R_B, h)$ . La vitesse et la longueur de la colonne fixent aussi la durée  $T$  de la séparation :

$$T = \frac{N_{tot}}{S \cdot U \cdot C_{CLtot}} + \frac{h}{U} \quad (3-8)$$

avec  $N_{tot}$  le nombre total de cellules (les cellules d'intérêt et les autres cellules) dans la suspension et  $C_{CLtot}$  la concentration totale en cellules. Cette durée doit rester raisonnable dans le cadre d'une application industrielle, et afin de ne pas altérer les cellules. L'ordre de grandeur dépend du nombre de cellules à trier, mais il est de l'ordre de plusieurs heures.

Dans cette partie nous allons réfléchir au dimensionnement de la colonne et au protocole de capture en fonction du rendement voulu. Le développement des cellules médicaments nécessitera de trier une quantité importante de cellules, de l'ordre de  $1000 \cdot 10^9$  cellules. Est ce que la chromatographie cellulaire est une méthode permettant de trier cette quantité de cellules avec un rendement raisonnable ? Quelle serait la durée du processus ? Si c'est le cas quelles doivent être les dimensions de la colonne et la vitesse de l'écoulement ? Nous allons réfléchir à ces questions dans la suite de ce chapitre.

### 3.3.1. La section de la colonne

La section  $S$  de la colonne n'influence pas le rendement. En effet la capture est un problème cinétique. Le temps caractéristique de capture dépend des caractéristiques des cellules (taille, densité, coefficient de diffusion) et de la taille des billes. Le rendement de la capture (si on ne considère pas la dissociation) est fixé par le rapport de ce temps caractéristique et du temps que les cellules passent dans la colonne. Le temps passé dans la colonne dépend de la vitesse de l'écoulement et de la longueur de la colonne, mais pas de la section.

Par contre la section de la colonne est un moyen de contrebalancer l'effet de la vitesse sur la durée de la capture. Si on diminue la vitesse par deux, l'efficacité de capture augmente (d'après nos observations expérimentales). Mais dans le même temps la durée de la séparation est multipliée par deux (cf. équation (3-8)). Par contre si la surface de la section de la colonne est doublée alors la durée est inchangée.

En se basant sur la taille de l'automate CliniMACS vendu par Miltenyi une section raisonnable de colonne est de l'ordre du  $cm^2$  pour trier quelques millions de cellules.

### 3.3.2. La concentration cellulaire

La concentration en cellules a la même influence que la section de la colonne sur les performances du tri : elle n'intervient pas sur le rendement de la capture mais elle joue sur la durée. On a intérêt à être le plus concentré possible afin de minimiser la durée de la capture. Cependant à partir d'une certaine concentration en cellules la viscosité de la suspension va augmenter, les cellules ne vont plus se comporter indépendamment les unes des autres et nos résultats ne seront plus pertinents pour décrire la capture cellulaire. Nous ne savons pas à partir de quelle concentration ce changement a lieu. Si on se base sur les protocoles de tri cellulaire déjà existant on constate que la technologie MACS est réalisée à une fraction volumique en cellules de 10% au maximum, ce qui représente une concentration limite de  $7.10^7$  cellules.mL<sup>-1</sup> ( $R_c=4 \mu\text{m}$ ).

### 3.3.3. Le rayon des billes

Le rayon des billes joue sur deux aspects : le rendement de la capture et le volume de la colonne. Afin de déterminer le rayon optimal des billes pour la capture des cellules les prédictions du modèle de Tufenkji sont représentées en Figure 3-25. L'efficacité de capture est tracée en fonction du rayon des billes, la vitesse de l'écoulement  $U$  est fixée à  $U = 3.10^{-2}$  cm.s<sup>-1</sup>.

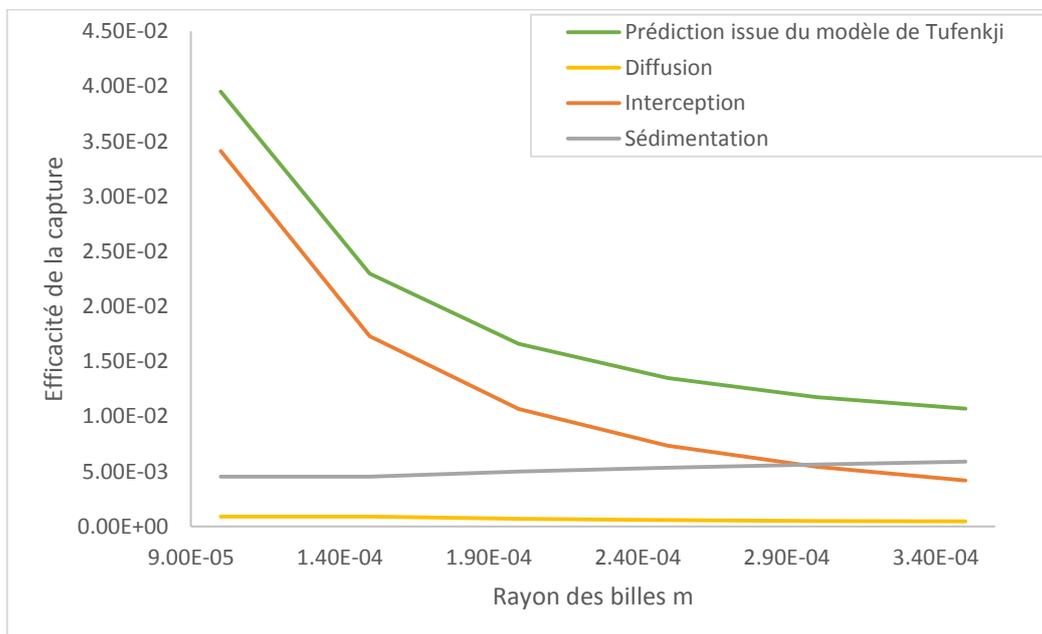


Figure 3-25 : Graphique représentant l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la taille des billes. La courbe verte est l'efficacité de capture totale selon le modèle de Tufenkji (équation (2-66)). La courbe jaune est l'efficacité de capture par diffusion selon le modèle de Tufenkji (équation (2-65)). La courbe grise est l'efficacité de capture par sédimentation déterminée selon le modèle de Tufenkji (équation (2-64)). La courbe orange est l'efficacité de capture par interception selon le modèle de Tufenkji (équation (2-63)). La vitesse de l'écoulement est  $3.10^{-4}$  m.s<sup>-1</sup>, le rayon des cellules est  $5.10^{-6}$  m, la température est 298 K, la viscosité est  $1.10^{-3}$  Pa.s, la constante de Hamaker est  $2.10^{-20}$  J, la masse volumique des cellules est  $1,06.10^3$  kg.m<sup>-3</sup>, la masse volumique du fluide est  $1.10^3$  kg.m<sup>-3</sup>, et la porosité est 0,40.

La diffusion est négligeable dans le processus de transport des cellules. C'est l'interception et la sédimentation qui sont responsables du transport des cellules à proximité des billes. La sédimentation dépend assez peu du rayon des billes. D'après le modèle de Yao la sédimentation est totalement indépendante du rayon des billes. Mais la prise en compte des interactions de VDW et hydrodynamiques dans le modèle de Tufenkji ajoute une dépendance au rayon des billes. Par contre l'efficacité de capture par interception diminue significativement lorsque la taille des billes augmente. Afin de maximiser le rendement de la capture nous devons donc prendre les billes les plus petites possibles. La limite minimale est fixée par la taille des pores de l'empilement qui doit permettre la circulation des cellules (cf. 2.1.12).

De plus en choisissant les billes les plus petites nous maximisons la surface de capture disponible pour un volume de colonne donné.

### 3.3.4. La vitesse d'écoulement et la longueur de la colonne

La vitesse de l'écoulement et la longueur sont deux paramètres clés lors de la conception d'une colonne chromatographique et de la mise au point du protocole. Afin d'étudier leur importance nous allons nous placer dans une situation concrète : le tri de cellules souches après une phase d'amplification cellulaire.

#### 3.3.4.1. Le tri de cellules souches après une phase d'amplification pour la thérapie cellulaire

Nous nous plaçons dans le cas du tri à grande échelle pour la thérapie cellulaire. On souhaite éliminer les cellules restées indifférenciées des cellules différenciées qui vont être utilisées comme « médicament ». Le nombre de cellules d'intérêt est de l'ordre de  $5 \cdot 10^{11}$  et leur proportion dans l'échantillon de départ est de l'ordre de 50%. Le nombre total de cellules dans l'échantillon est donc  $1 \cdot 10^{12}$ . Les exigences sont un rendement  $r=90\%$ . Les valeurs des autres paramètres sont résumées dans le Tableau 3-1.

| Paramètres                                  | Valeur         |
|---|----------------|
| $R_c \mu\text{m}$                           | 5              |
| $C_{\text{Clotot}} \text{cellules.mL}^{-1}$ | $7 \cdot 10^7$ |
| $R_B \mu\text{m}$                           | 150            |
| Rayon de la section cm                      | 5              |

Tableau 3-1 : Tableau résumant les paramètres utilisés pour déterminer la longueur de la colonne  $h$  et la durée de séparation  $T$  en fonction du rendement désiré.

Le volume de suspension à passer est 14 litres. A partir de l'équation (3-7) on détermine la longueur de colonne nécessaire pour un rendement donné :

$$h(r) = -\frac{4 \cdot R_B}{3 \cdot \phi \cdot \eta} * \ln(1 - r) \quad (3-9)$$

La Figure 3-26 représente en orange la longueur de colonne nécessaire pour avoir un rendement de 90%, en fonction de la vitesse de l'écoulement. La courbe bleue représente la durée de la séparation en fonction de la vitesse (cf. équation (3-8)).

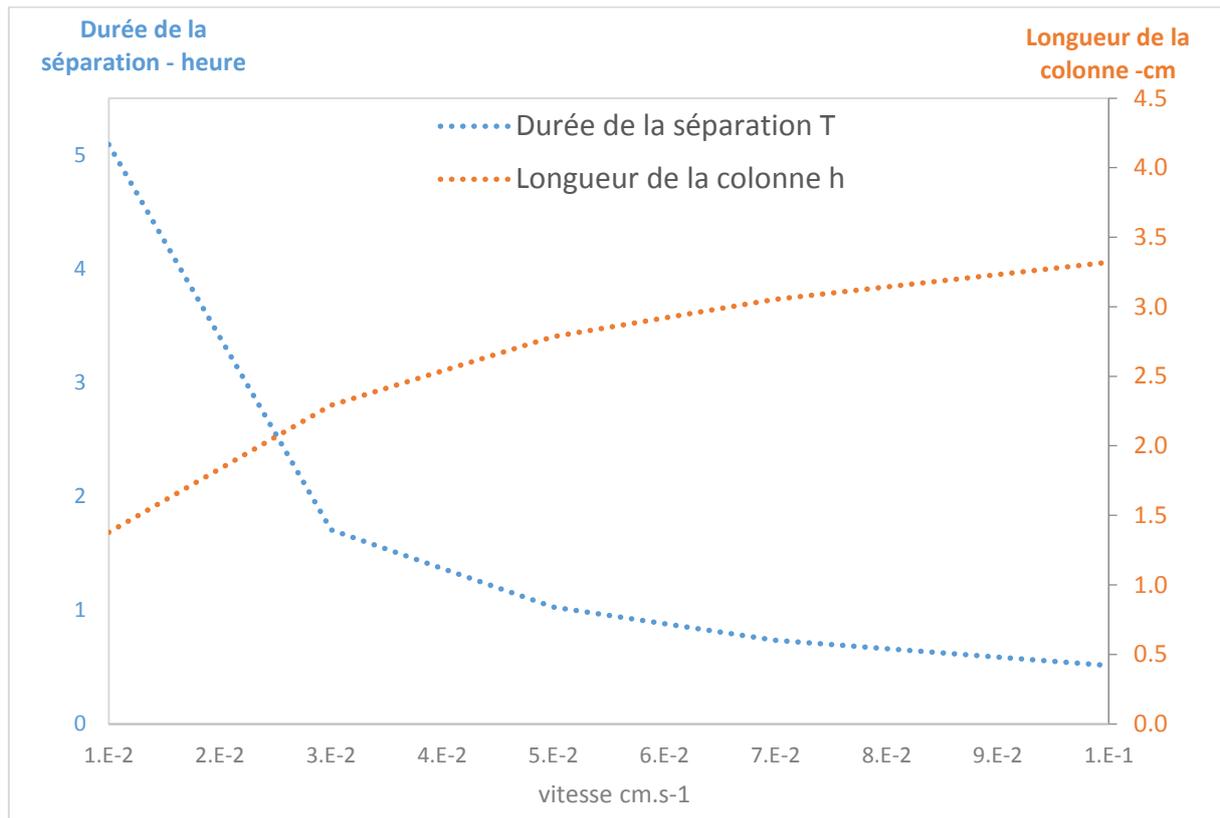


Figure 3-26 : Graphique représentant la longueur de colonne h nécessaire (eq.(3-9)) pour avoir un rendement de capture de 90% et la durée de séparation T associée (eq. (3-8)). Le nombre de cellules d'intérêt est de l'ordre de  $5 \cdot 10^{11}$  et leur proportion dans l'échantillon de départ est de 50%. Les efficacités de capture sont calculées à partir du modèle de Tufenkji. Le rayon des billes est  $150 \mu\text{m}$ , le rayon des cellules est  $5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ , la température est  $298 \text{ K}$ , la viscosité est  $1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$ , la constante de Hamaker est  $2 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ , la masse volumique des cellules est  $1,06 \cdot 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , la masse volumique du fluide est  $1 \cdot 10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , et la porosité est 0,4. Les autres paramètres sont donnés dans le Tableau 3-1.

On constate qu'il existe un ensemble de couples vitesse d'écoulement-longueur de colonne permettant de respecter la contrainte sur le rendement. Lorsque la vitesse augmente la longueur de colonne nécessaire augmente car comme nous le voyons en Figure 3-27, lorsque la vitesse augmente l'efficacité de capture d'une bille par sédimentation diminue. Il faut donc que les particules rencontrent un plus grand nombre de billes pour parvenir à un même rendement r.

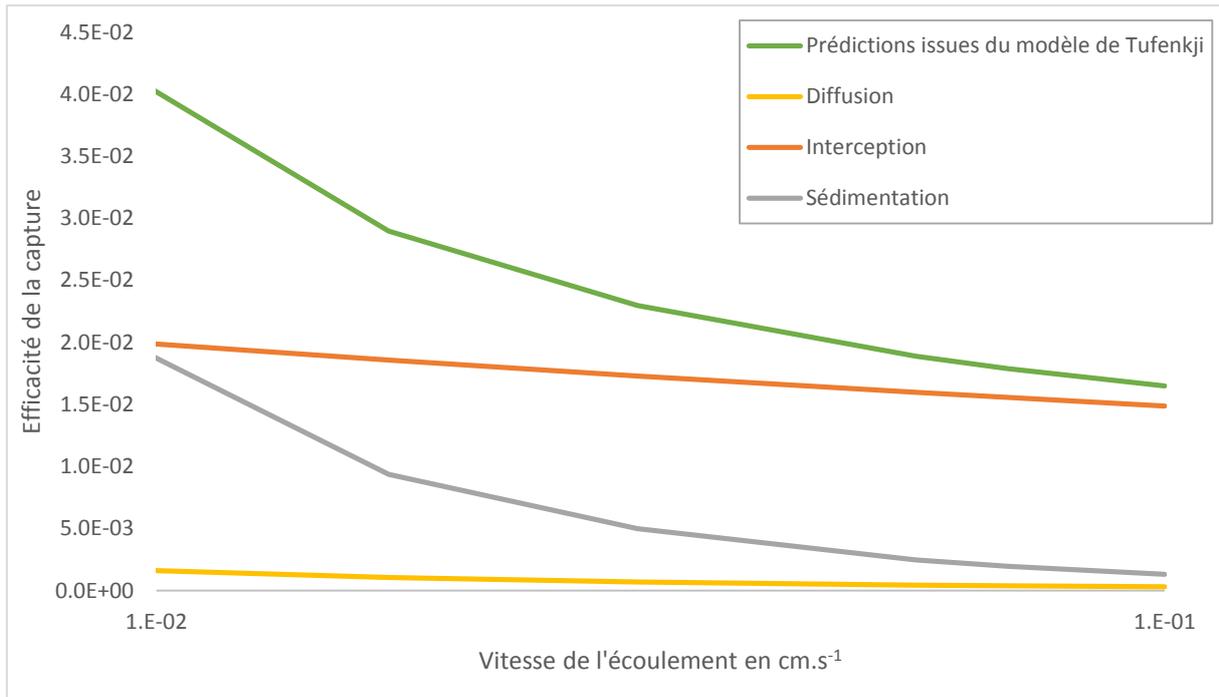


Figure 3-27 : Graphique représentant l'évolution de l'efficacité de capture en fonction de la vitesse de l'écoulement. La courbe verte est l'efficacité de capture totale selon le modèle de Tufenkji (équation (2-66)). La courbe jaune est l'efficacité de capture par diffusion selon le modèle de Tufenkji (équation (2-65)). La courbe grise est l'efficacité de capture par sédimentation selon le modèle de Tufenkji (équation (2-64)). La courbe orange est l'efficacité de capture par interception selon le modèle de Tufenkji (équation (2-63)). Le rayon des billes est  $150 \mu\text{m}$ , le rayon des cellules est  $5.10^{-6} \text{ m}$ , la température est  $298 \text{ K}$ , la viscosité est  $1.10^{-3} \text{ Pa.s}$ , la constante de Hamaker est  $2.10^{-20} \text{ J}$ , la masse volumique des cellules est  $1,06.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , la masse volumique du fluide est  $1.10^3 \text{ kg.m}^{-3}$ , et la porosité est  $0,4$ .

Sur la gamme de vitesses étudiée la longueur de colonne nécessaire est comprise entre 1 et 3,5 cm, ce n'est donc pas un paramètre limitant. La durée de la séparation est comprise entre 30 minutes et 5,5 heures, ce qui est raisonnable pour trier  $10^{12}$  cellules, c'est-à-dire 14 litres de suspension. La durée est principalement fixée par le temps nécessaire pour faire passer tout l'échantillon dans la colonne, mais ce n'est pas le passage en lui-même dans la colonne qui est important (cf. équation (3-8)) :

$$\frac{N_{\text{tot}}}{S \cdot U \cdot C_{\text{CLtot}}} \gg \frac{h}{U} \quad (3-10)$$

Raccourcir la colonne pour réduire la durée de capture n'est donc pas pertinent. Par contre augmenter la section de la colonne ou bien la concentration en cellules est un moyen efficace de réduire la durée de la capture.

Depuis le début nous considérons que nous faisons un seul passage dans la colonne, mais nous pouvons faire plusieurs passages afin d'augmenter le rendement. Si on fait  $p$  passages, le rendement de la capture est :

$$r = 1 - \exp\left(-\frac{3 \cdot \phi}{4 \cdot R_B} * \eta * h * p\right) \quad (3-11)$$

Et la durée  $T$  est multipliée par  $p$ . Pour un rendement donné, plus on fait de passages plus on peut utiliser une colonne courte. Cela présente deux avantages :

- réduire la longueur de la colonne. A l'échelle du centimètre ça n'a pas beaucoup d'intérêt, par contre s'il faut plusieurs mètres ça peut être intéressant.
- réduire la quantité de billes nécessaire et donc le coût financier.

La longueur de la colonne peut être fixée par une autre contrainte que le rendement : le taux d'occupation des billes. Il faut au minimum une surface de bille égale à la surface occupée par toutes les cellules d'intérêt. Dans l'exemple précédent la longueur de colonne nécessaire afin d'avoir une surface de bille suffisante est 150 cm. La longueur de la colonne n'est pas fixée par le rendement souhaité mais par la surface de billes nécessaire lorsqu'un nombre de cellules important est trié, de l'ordre de  $10^{12}$ . Dans ce cas afin de réduire la longueur de la colonne il est possible d'augmenter la section.

#### 3.3.4.2. Quels sont les avantages de la présence d'un écoulement ?

Sachant que le rendement de la capture diminue avec la vitesse il est pertinent de se demander quel est l'intérêt d'un écoulement. Pourquoi ne pas remplir la colonne avec la suspension cellulaire, laisser incuber sans écoulement, puis rincer ? Avec ce protocole le rendement doit être de 100%, car toutes les cellules atteignent la surface grâce à la sédimentation. De plus la durée de la séparation, à partir du moment où les cellules sont dans l'empilement de billes, est de l'ordre de 30 secondes (la taille des pores est autour de  $100 \mu\text{m}$  et la vitesse de sédimentation des cellules est de  $10^{-6} \text{ m.s}^{-1}$ ).

Un premier point est que sans écoulement toutes les cellules (d'intérêt ou pas) sédimentent et occupent la surface des billes d'alginate. En présence d'un écoulement, seules les cellules d'intérêt adhèrent à la surface. Sans écoulement il faut donc prévoir une surface de billes pour toutes les cellules pas seulement pour les cellules d'intérêt. Si la surface disponible est moins importante que la surface de toutes les cellules de l'échantillon, certaines cellules vont sédimenter sur des emplacements déjà occupés par les cellules. En absence d'écoulement la quantité de billes nécessaire et donc la taille de la colonne peuvent être plus grandes que dans le cas d'un tri avec écoulement.

Un second point qui est sûrement la raison principale concerne la spécificité de la capture. En absence d'écoulement les interactions non spécifiques peuvent être importantes, et jusqu'à 30% des cellules capturées ne sont pas des cellules d'intérêt<sup>12,13</sup>.

Nous avons nous-même observé ce phénomène lors des expériences de capture spécifique avec les billes d'alginate biotinylées. La Figure 3-28 représente des images de microscopie optique de billes

d'alginate après la capture de particules micrométriques recouvertes de streptavidines (cf. Figure 3-9). La capture a été effectuée dans différentes conditions d'agitation. Dans le premier cas les billes et les particules ne sont pas agitées, dans le second cas elles sont agitées sur un agitateur rotatif (agitation douce), et dans le dernier cas elles sont agitées sur un vortex (agitation forte). A gauche les billes ont été fonctionnalisées avec de la biotine avant la capture, à droite les billes ne sont pas fonctionnalisées.

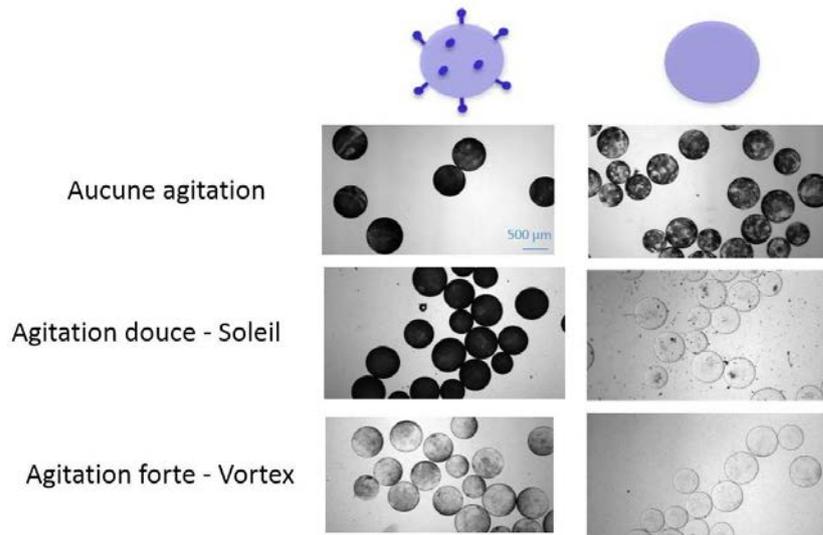


Figure 3-28 : Images de microscopie optique de billes d'alginate greffées avec de la biotine (colonne de gauche) ou non greffées (colonne de droite). Ces billes ont été mises en présence de particules micrométriques recouvertes de streptavidines pendant deux heures. Durant cette étape trois modes d'agitation ont été testés : aucune agitation, une agitation douce sur un soleil (agitateur rotatif) et une agitation forte sur un vortex.

Les billes d'alginate sont initialement transparentes, et donc plus une bille est noire plus elle a capturé de particules. Pour évaluer la pureté de la capture il faut comparer la capture sur les billes d'alginate fonctionnalisées et la capture non spécifique sur les billes témoins. Nous constatons que la présence d'un écoulement influence de manière importante la pureté de la capture. Sans agitation, la pureté est réduite car les interactions non spécifiques sont favorisées. L'agitation douce est optimale car elle favorise les interactions spécifiques et défavorise les interactions non spécifiques.

D'ailleurs le tri par affinité en présence d'un écoulement est un moyen de séparer les cellules portant le marqueur CD34 en fonction de sa densité membranaire<sup>14</sup>.

### 3.3.5. Conclusion

Dans cette partie nous avons réfléchi aux conséquences de notre étude concernant la cinétique de capture sur le dimensionnement d'une colonne chromatographique et le protocole à mettre en place. La section de la colonne et la concentration cellulaire sont des paramètres permettant de jouer sur la durée de séparation. La vitesse de l'écoulement et la longueur de la colonne contrôlent le rendement

de la capture. La taille des billes influence aussi le rendement, et il ressort qu'il faut choisir le rayon le plus petit possible, c'est-à-dire permettant de laisser circuler les cellules dans l'empilement.

En nous basant sur les prédictions de Tufenkji, nous constatons que la chromatographie cellulaire peut permettre de trier un nombre de cellules aussi important que  $1 \cdot 10^{12}$ , en un temps raisonnable.

Pour conclure il est important de garder en tête que la présence du flux n'est pas favorable pour le rendement. Par contre il semble être essentiel à la pureté de l'échantillon final.

### 3.4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié la capture spécifique. Pour cela nous avons choisi un système nous permettant de mesurer la cinétique d'association avec le dispositif expérimental mis au point au chapitre précédent. Nous n'avons pas pu utiliser des billes d'alginate car la fonctionnalisation de ce matériau s'est avérée compliquée. Nous avons donc utilisé des billes de verre pour lesquelles nous disposons d'un protocole de greffage de streptavidines satisfaisant. Afin de pouvoir suivre la cinétique de capture en observant les colonnes les cellules doivent être marquées. Nous avons donc eu l'idée d'utiliser des cellules marquées naturellement : les globules rouges. Ces cellules sont fonctionnalisées avec de la biotine via un greffage covalent ou bien grâce à un anticorps biotinylé. La quantification de la capture repose sur une mesure analogue à la densité optique.

Comme pour l'étude du transport nous avons étudié la cinétique de capture en fonction de la vitesse d'écoulement des cellules. L'efficacité de capture diminue lorsque la vitesse augmente. En comparant nos données expérimentales aux prédictions ne prenant en compte que le transport des cellules à proximité de la surface des billes on constate que pour des vitesses d'écoulement de l'ordre de  $10^{-4}$  m.s<sup>-1</sup> le transport est suffisant pour décrire la cinétique de capture spécifique des cellules. Par contre lorsque la vitesse est de l'ordre de  $10^{-3}$  m.s<sup>-1</sup> le transport ne décrit plus seul la cinétique de capture et la formation du lien intervient. Le premier point important et positif est qu'il existe un régime où la formation du lien n'est pas limitante. En se plaçant dans la bonne gamme de vitesses, la capture de cellules est seulement limitée par les collisions avec les billes, c'est à dire que toutes les cellules atteignant la surface des billes sont capturées.

Il serait intéressant de travailler sur ce qui limite la formation du lien afin d'étendre la gamme de vitesses où cette étape n'est pas limitante. Est-ce que c'est la formation du premier lien ? Est-ce que c'est la consolidation de ce premier lien par d'autres liens afin de résister au flux ? Et quels phénomènes contrôlent la cinétique de formation de ces liens ? Est-ce que c'est le fait que deux molécules se trouvent assez proches ? Est-ce que c'est le fait de trouver la bonne orientation ? Est-ce que c'est la formation des interactions non spécifiques qui composent le lien ?

Cette étude sur la capture spécifique nous a en outre montré que la capture spécifique de globules rouges via des anticorps biotinylés est possible et qu'elle est similaire à la capture de globules rouges biotinylés. De plus la quantité de cellules capturées dans le montage expérimental est déjà à l'échelle des besoins de certaines applications médicales, comme la greffe de CSH. Si on extrapole nos connaissances afin de dimensionner une colonne chromatographique pour capturer des cellules à échelle industrielle, on montre qu'il est envisageable de traiter des volumes allant jusqu'à dix litres.

Pour développer une nouvelle méthode de tri cellulaire commerciale pour des applications cliniques, il est indispensable de comprendre les mécanismes physiques en jeu, mais il faut aussi réfléchir à l'automatisation du procédé. Dans le prochain chapitre je vais présenter la réflexion que nous avons menée à ce sujet.

### 3.5. Bibliographie

1. Hiatt, A. & Pauly, M. Monoclonal antibodies from plants: A new speed record. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14645–14646 (2006).
2. Lu, B., Smyth, M. R. & O'Kennedy, R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* **121**, 29R–32R (1996).
3. Miyamoto, S. & Kollman, P. Absolute and Relative Binding Free-Energy Calculations of the Interaction of Biotin and Its Analogs with Streptavidin Using Molecular-Dynamics Free-Energy Perturbation Approaches. *Proteins-Struct. Funct. Genet.* **16**, 226–245 (1993).
4. Research, C. for B. E. and. Premarket Approvals (PMAs) and Humanitarian Device Exemptions (HDEs).at<<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/default.htm>>
5. Rolland, L., Santanach-Carreras, E., Delmas, T., Bibette, J. & Bremond, N. Physicochemical properties of aqueous core hydrogel capsules. *Soft Matter* **10**, 9668–9674 (2014).
6. Neish, C. S., Martin, I. L., Henderson, R. M. & Edwardson, J. M. Direct visualization of ligand-protein interactions using atomic force microscopy. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1943–1950 (2002).
7. Torres, L. G., Velasquez, A. & Brito-Arias, M. A. Ca-alginate spheres behavior in presence of some solvents and water-solvent mixtures. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **02**, 8 (2011).

8. Denomme, G. A. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. *Transfus. Med. Rev.* **18**, 203–231 (2004).
9. Qureshi, M. H., Yeung, J. C., Wu, S.-C. & Wong, S.-L. Development and Characterization of a Series of Soluble Tetrameric and Monomeric Streptavidin Muteins with Differential Biotin Binding Affinities. *J. Biol. Chem.* **276**, 46422–46428 (2001).
10. Cohen-Tannoudji, L. *et al.* Measuring the kinetics of biomolecular recognition with magnetic colloids. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 108301 (2008).
11. Dupire, J., Socol, M. & Viallat, A. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 20808–20813 (2012).
12. Kumar, A. & Srivastava, A. Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. *Nat. Protoc.* **5**, 1737–1747 (2010).
13. Dainiak, M. B., Galaev, I. Y. & Mattiasson, B. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *J. Chromatogr. A* **1123**, 145–150 (2006).
14. Mahara, A. & Yamaoka, T. Antibody-Immobilized Column for Quick Cell Separation Based on Cell Rolling. *Biotechnol. Prog.* **26**, 441–447 (2010).

---

## 4. Automate de tri cellulaire

---

### 4.1. Introduction

L'objectif final de cette thèse est le développement d'une technique de tri cellulaire pour des applications thérapeutiques. La technologie développée doit, à terme, être automatisable et développée dans des conditions GMP. Dans un premier temps nous avons travaillé sur une maquette de preuve de principe de la capture de cellules par des billes. En effet dans le cadre du dispositif CIFRE j'ai bénéficié du savoir-faire du partenaire industriel, Bertin Technologies, sur ces aspects. Cette entreprise a une expertise dans le développement de prototypes et d'équipements de laboratoire, en particulier dans le secteur de la santé. Elle a notamment conçu des automates de culture chargés de produire et d'amplifier les greffons cellulaires utilisés dans la thérapie de CellProthera.

L'automatisation d'un protocole a des objectifs divers : permettre de réaliser un plus grand nombre d'expériences en accélérant le processus global ou en parallélisant les expériences, améliorer la reproductibilité entre les expériences, améliorer la sécurité de l'expérimentateur, maîtriser quantitativement une action... Dans notre cas nous voulions développer un démonstrateur permettant de trier des cellules de manière contrôlée et reproductible afin d'optimiser le protocole de tri.

La méthodologie de développement du prototype d'automate suit le « cycle en V », qui est un modèle de gestion de projet. La première étape est la définition du cahier des charges. Il faut pour cela lister les fonctions basiques que l'automate doit réaliser telle que le stockage de solutions par exemple. Il faut en parallèle analyser l'ensemble des actions réalisées par l'expérimentateur. Selon l'objectif et le délai (dans notre cas six mois) celles devant être automatisées sont définies. Chaque besoin est alors spécifié précisément. Dans un second temps une étude de conception est menée. L'automate est ensuite réalisé. Ensuite il y a une phase de vérification afin de contrôler que l'automate est conforme aux exigences du cahier des charges. Finalement, l'utilisation de l'automate permet d'identifier ses forces et ses faiblesses en vue d'une optimisation ultérieure.

Dans ce chapitre je vais dans un premier temps présenter les grandes lignes du cahier des charges, puis je décrirai le démonstrateur réalisé par Bertin Technologies. Ensuite je ferai un retour d'expérience issu de mon utilisation.

## 4.2. Description de l'automate de tri cellulaire développé par Bertin Technologies

### 4.2.1. La définition du cahier des charges

Dans les chapitres précédents nous nous sommes concentrés sur la capture des cellules par les billes. Nous voulons à présent un démonstrateur nous permettant de réaliser le tri cellulaire dans son ensemble de manière contrôlée. Les actions à automatiser sont celles résumées en Figure 4-1.

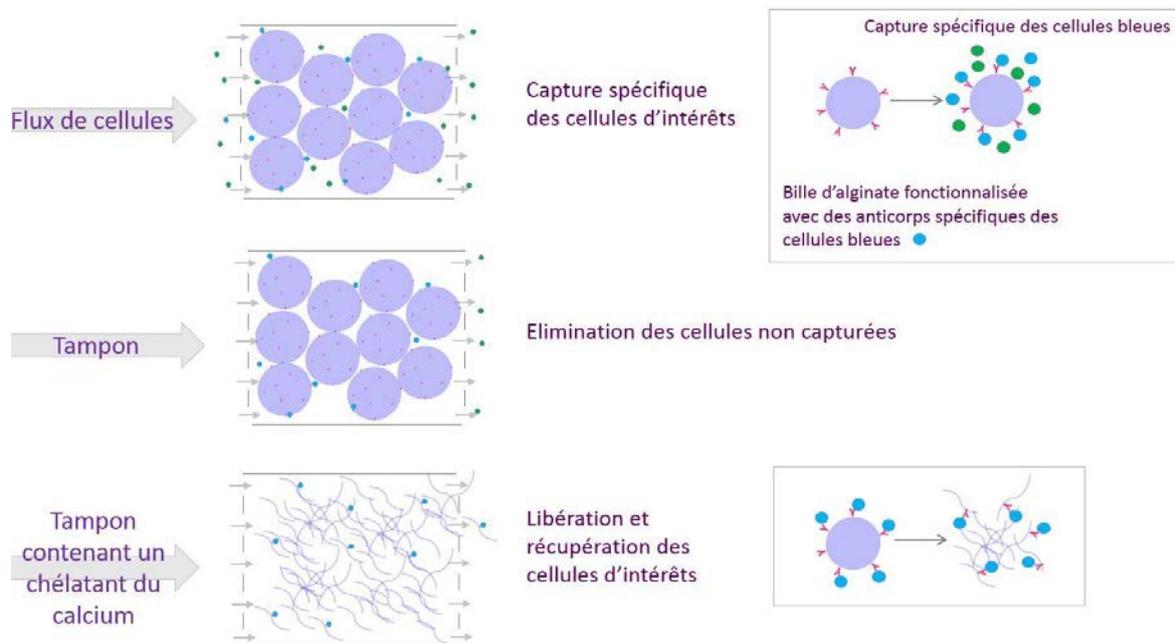


Figure 4-1 : Représentation schématique des différentes étapes de tri cellulaire par chromatographie d'affinité. La suspension cellulaire s'écoule dans une colonne contenant des billes d'alginate fonctionnalisées avec des anticorps. Les cellules présentant l'antigène complémentaire de l'anticorps sont alors capturées à la surface des billes. Ensuite une solution tampon s'écoule dans la colonne afin d'éliminer les cellules qui n'ont pas été retenues par les billes. Les cellules d'intérêt sont finalement libérées des billes grâce à l'action d'un chélatant du calcium qui détruit le gel d'alginate.

Dans un premier temps la suspension cellulaire s'écoule dans la colonne contenant les billes fonctionnalisées avec les anticorps. Les cellules présentant l'antigène complémentaire de l'anticorps sont capturées à la surface des billes. Une solution tampon s'écoule alors dans la colonne afin d'éliminer les cellules qui n'ont pas été retenues par les billes. Les cellules d'intérêt sont ensuite libérées des billes grâce à l'action d'un chélatant du calcium qui détruit le gel d'alginate. Puis les cellules d'intérêt sont récupérées hors de la colonne grâce à un flux de tampon. Une autre voie pour libérer les cellules des billes est l'application d'une force de cisaillement en augmentant le débit du tampon.

Cette séquence nous dicte les fonctions principales que doit avoir l'automate:

- stockage de solutions en entrée et en sortie
- connexions entre les contenants des solutions
- distribution des solutions
- zone de séparation retenant les billes mais laissant circuler les cellules.

Les exigences et les contraintes associées à ces fonctions sont hiérarchisées en 3 catégories : primordiale, importante, souhaitable. De manière générale tous les éléments en contact avec les cellules doivent être stérilisables, biocompatibles et éviter l'adhésion des cellules.

Chez Bertin Technologies le développement de cet automate a nécessité des compétences diverses en électronique, informatique, automatisme et mécanique.

Je vais maintenant présenter la réflexion menée sur les différentes parties de l'automate et les solutions adoptées.

#### 4.2.2. La zone de séparation contenant les billes pour la capture de cellules

La zone de séparation contient les billes qui vont capturer les cellules d'intérêt. Sa structure est donc primordiale car elle va conditionner l'efficacité de la capture. Au moment de la réflexion sur la colonne nous ne savions pas encore si pour capturer les cellules un seul passage de la suspension suffirait, ou s'il fallait faire plusieurs passages dans le même sens ou dans les 2 sens, est-ce qu'il fallait un lit compact de billes, ou un lit fluidisé.... ? Nous avons donc voulu garder la plus grande flexibilité en ayant une colonne qui retenait les billes à ses deux extrémités. Quant aux cellules, elles doivent pouvoir entrer et sortir de la colonne. Cela est permis par la présence de deux tamis à chaque extrémité dont les pores font 70 $\mu$ m. Le choix de cette taille est un compromis qui permet de laisser circuler les cellules hors de la zone de séparation mais qui maintient les billes à l'intérieur.

La présence de filtres des deux côtés complique la structure car dans le même temps la colonne doit pouvoir être remplie avec les billes. Comme cela est représenté Figure 4-2 les extrémités sont démontables.

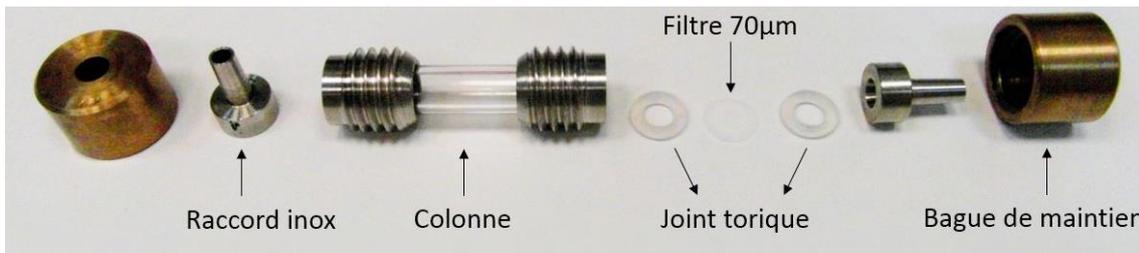


Figure 4-2: Photographie de la zone de séparation démontée. Les composants des deux côtés sont identiques. Les filtres sont maintenus entre deux joints toriques à chaque extrémité. Les raccords inox sont posés au-dessus des joints toriques, puis les bagues viennent maintenir l'ensemble en se vissant sur la colonne. Les raccords permettent de connecter la colonne aux tubulures. Les raccords et les bagues sont montrés selon deux orientations.

Nous nous sommes interrogés sur l'homogénéité du flux de cellules dans la colonne. Nous avons réfléchi à mettre un mélangeur aux extrémités, mais toutes les solutions envisagées étaient compliquées. Nous avons décidé qu'il ne devait pas y avoir de changement brutal de diamètre dans la colonne et dans le système en général, et que cela pourrait être suffisant pour avoir un écoulement homogène.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent le rendement de la capture dans la colonne chromatographique dépend de la vitesse et de la longueur de la colonne. La vitesse dans la colonne est quant à elle déterminée par le débit et la section de la colonne. Ces deux grandeurs fixent aussi la durée de la séparation. La forme de la colonne est donc déterminante dans l'efficacité de cette technologie. Les paramètres que nous avons imposés sont le diamètre de la colonne, 5 mm et le débit  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pour avoir un rendement de capture de 80% avec des billes de  $150\mu\text{m}$  de diamètre, la longueur de la colonne doit être de l'ordre de 3 cm d'après les équations de Tufenkji. La colonne avec les dimensions définies ci-dessus, 0.5 cm de diamètre et 3 cm de longueur, contient  $4,2\cdot 10^7$  billes de verre de  $150 \mu\text{m}$  de rayon. La surface de billes permet de capturer  $150\cdot 10^6$  cellules avec un rayon de  $5 \mu\text{m}$ . Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que 30% de la surface des billes de verre pouvait être occupée par les globules rouges capturés sans que cela affecte la cinétique de capture. Si les cellules occupent seulement 30% de la surface de billes de verre, la colonne permet de capturer  $45\cdot 10^6$  cellules, c'est-à-dire le nombre de CSH contenu dans 10 sangs de cordon ombilical. Nous avons donc choisi une colonne avec ces dimensions car elle nous permet de travailler à une échelle pertinente en termes de nombre de cellules capturées.

Les matériaux choisis (verre, silicone) répondent aux contraintes de biocompatibilité, stérilisabilité et de non adhésion des cellules.

Cette colonne s'insère dans un système fluide que nous allons maintenant présenter.

#### 4.2.3. L'automate dans son intégralité – stockage et distribution des différentes solutions

La zone centrale du circuit est constituée de la colonne contenant les billes d'alginate et de deux seringues de part et d'autre (cf. Figure 4-3). C'est entre ces deux seringues que la suspension cellulaire va transiter durant les allers-retours. Une seringue se vide dans l'autre, et la suspension cellulaire traverse la colonne. La suspension cellulaire contenue dans la zone en pointillé ne passe pas dans la colonne, c'est donc un volume mort qu'il faut minimiser.

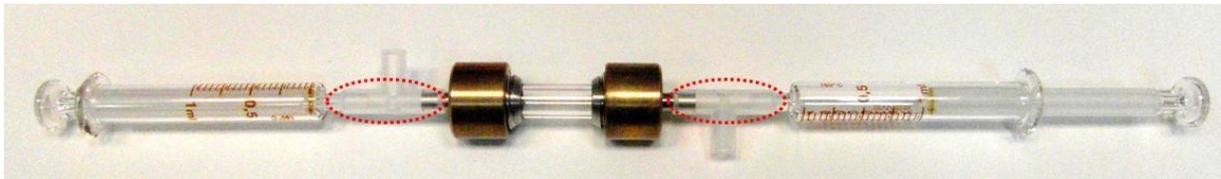


Figure 4-3: Photographie de la colonne de séparation et des seringues entre lesquelles se font les allers-retours de la suspension cellulaire pendant la phase de capture.

Cette zone s'insère dans un système global permettant de stocker et de distribuer les solutions.

L'automate dans son ensemble est représenté en Figure 4-4, avec un schéma explicatif en dessous.

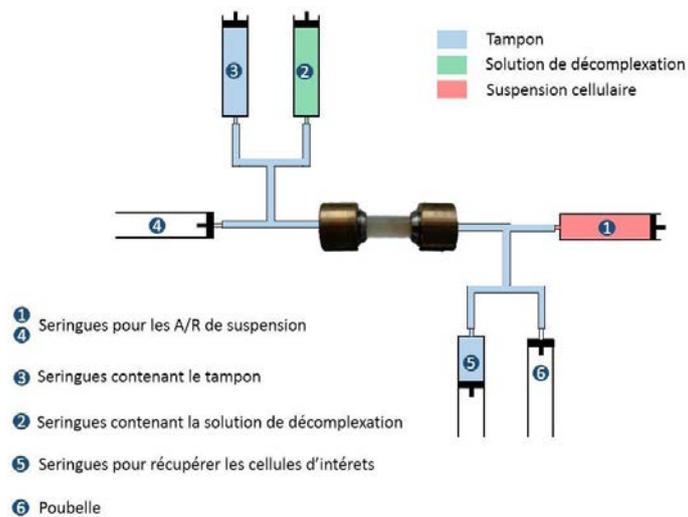
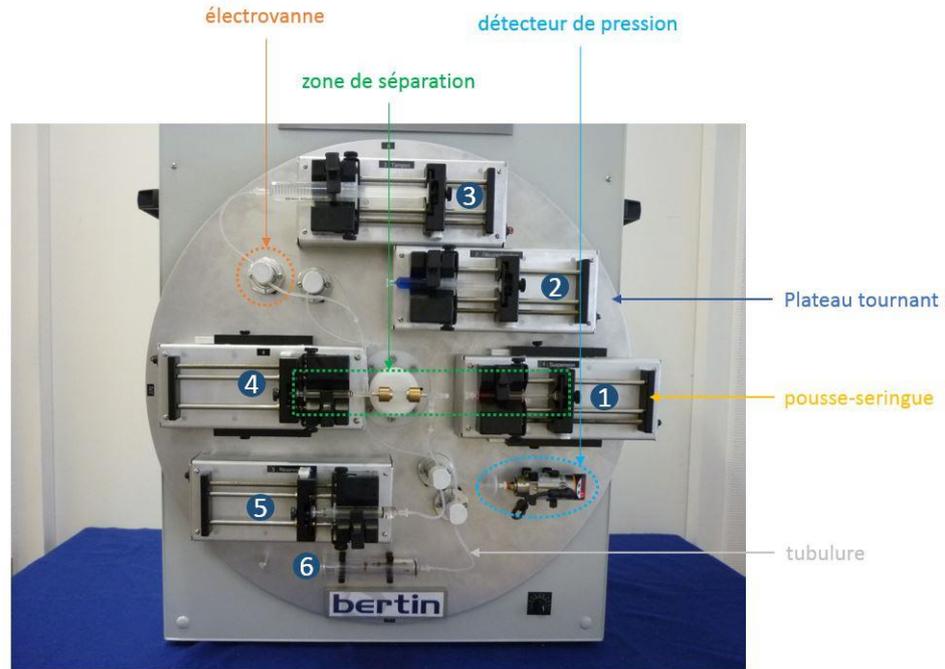


Figure 4-4: Photographie (haut) et représentation schématique (bas) du démonstrateur de tri cellulaire. Sur la photographie nous pouvons identifier les éléments suivants : les seringues contenant les solutions, les pousse-seringues permettant de mettre en mouvement les solutions, les électrovannes qui empêchent les contaminations entre les solutions contenues dans les seringues, les tubulures reliant les seringues entre elles, la zone de séparation contenant les billes pour la séparation des cellules, un détecteur de pression qui arrête le processus en cas de surpression par mesure de sécurité, et le plateau tournant qui évite le phénomène de sédimentation et limite la perte des cellules dans les volumes morts. Le schéma représente le démonstrateur au début du processus de tri.

Pour mettre les fluides en mouvement nous avons choisi d'utiliser des pousse-seringues car c'est la solution la plus flexible et la plus simple à mettre en place. Les différentes solutions sont stockées dans des seringues qui sont numérotées de 1 à 6. Les mouvements de liquide se font de la seringue de départ contenant le fluide vers la seringue 6 servant de « poubelle ». Afin d'éviter la pollution entre

les seringues et les différentes étapes, des électrovannes ont été placées sur les tubulures comme cela est montré sur la Figure 4-4.

Lors des expériences de capture des globules rouges par les billes de verre, j'ai remarqué que plus le débit est faible plus la concentration  $C_1$  en globules rouges en amont des billes de verre dans le capillaire est inférieure à la concentration en globules rouges de la solution de départ  $C_0$ , comme cela est représenté sur la Figure 4-5.

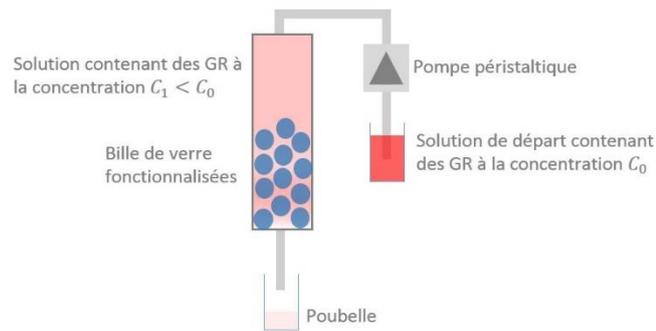


Figure 4-5 : Représentation schématique du dispositif expérimental permettant la capture des globules rouges (GR) par les billes de verre. Lors de ces expériences nous avons constaté que la concentration  $C_1$  est inférieure à la concentration  $C_0$ . Cela est dû à la perte des globules rouges dans les volumes morts du dispositif.

Le Tableau 4-1 résume les concentrations en globules rouges  $C_0$  (cellule de Malassez) et  $C_1$  (mesure de densité optique), à différentes vitesses.

| Vitesse de l'écoulement dans le capillaire m.s <sup>-1</sup> | $C_0$ cellules.mL <sup>-1</sup> | $C_1$ cellules.mL <sup>-1</sup> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| $4.10^{-3}$  | $7.10^7$                        | $7.10^7$                        |
| $7.10^{-4}$  | $9.10^6$                        | $8.10^6$                        |
| $4.10^{-4}$  | $8.10^6$                        | $3.10^6$                        |

Tableau 4-1 : Concentration en globules rouges en deux endroits distincts du dispositif expérimental représenté Figure 4-5 en fonction de la vitesse de l'écoulement.  $C_0$  est la concentration en globules rouges dans la solution de départ.  $C_1$  est la concentration en globules rouges dans le capillaire en amont des billes de verre.

Nous constatons dans le Tableau 4-1 que lorsque la vitesse d'écoulement dans le capillaire est supérieure à  $7.10^{-4}m.s^{-1}$  la concentration  $C_0$  est équivalente à la concentration  $C_1$ . Par contre lorsque la vitesse d'écoulement est de  $4.10^{-4}m.s^{-1}$  la concentration  $C_1$  est quasiment trois fois inférieure à la concentration initiale en globules rouges  $C_0$ .

De plus à la fin des expériences lorsque je rince le système avec du tampon, plus le débit est faible, plus les tubulures restent rouges c'est-à-dire que des globules rouges sont à leur surface et cela est concentré sur la partie inférieure du tube, c'est-à-dire du côté où les cellules sédimentent. Ces observations nous suggèrent que pendant leur transport de la solution de départ vers le capillaire contenant les billes pour la capture, les globules rouges sédimentent. Lorsqu'ils atteignent la surface

du tube leur transport vers le capillaire est stoppé. Pour limiter ce phénomène les ingénieurs de Bertin Technologie ont décidé de mettre tout le système sur un plateau tournant comme on le voit sur la photographie en Figure 4-4. L'idée est que lorsque le système fait un tour de 180° les GR qui auront sédimenté sur la paroi des tubes seront remis en suspension grâce à la gravité.

#### 4.2.4. Séquence des étapes permettant de trier les cellules

Nous avons mis au point une séquence d'étapes permettant de réaliser le tri cellulaire, de la capture à la libération des cellules. Cette séquence a été optimisée afin de réduire le coût et l'encombrement de la machine ainsi que la durée du processus. Pour cela nous avons minimisé le nombre de contenants, le nombre d'étapes, et le nombre de pousse-seringues et de vannes nécessaires.

Les seringues sont préalablement remplies manuellement avec les différentes solutions comme cela est représenté sur le schéma en Figure 4-4. La zone de séparation est remplie avec les billes fonctionnalisées. Puis les seringues et la zone de séparation sont connectées entre elles. Le déroulement automatique débute alors. La suspension passe de la seringue 1 à la seringue 4 plusieurs fois afin que les cellules d'intérêt soient capturées. Puis la suspension est envoyée dans la seringue 6, poubelle. Au début nous souhaitons que durant cette étape le disque tourne en permanence pour éviter la perte des cellules par sédimentation dans les volumes morts. Par la suite nous avons appris, grâce aux expériences avec les billes d'alginate, que la sédimentation était un phénomène important pour la capture sur les billes. Nous avons donc modifié cette étape : le disque ne tourne plus en permanence mais il effectue une rotation entre chaque passage de la suspension cellulaire dans la colonne afin que la seringue qui se vide soit au-dessus de celle qui se remplit. Ensuite, les cellules d'intérêt sont récupérées soit en appliquant une force hydrodynamique soit grâce à un agent chimique. Dans le premier cas, du tampon est envoyé de la seringue 3 vers la seringue 5 avec une vitesse suffisante pour détacher les cellules sans les abimer. Dans le second cas la colonne est remplie avec la solution de décomplexation. Il faut ensuite attendre le temps que les cellules soient libérées. Puis les cellules d'intérêt sont récupérées en envoyant du tampon de la seringue 3 vers la seringue 5. Le pilotage se fait via une interface homme/machine photographiée en Figure 4-6.



Figure 4-6: Ecran de pilotage du démonstrateur de tri cellulaire. Pour chaque étape il faut définir les paramètres suivants : débit, volume, et position du disque tournant.

Pour chaque étape il faut définir les paramètres suivants : débit, volume, et position du disque tournant.

Maintenant que l'automate développé par Bertin Technologies a été décrit dans son intégralité, je vais présenter mon retour d'expérience.

### 4.3. Conformité de l'automate et retour d'expérience

Une fois l'automate mis au point il faut vérifier qu'il est conforme au cahier des charges.

Dans un premier temps nous avons vérifié que toutes les étapes se déroulaient correctement en remplissant chaque seringue avec une solution colorée différente. Une fois que l'automate est monté son utilisation est simple. L'écran tactile permet aisément de régler tous les paramètres, et les étapes se déroulent sans incident. Pour le moment nous n'avons pas pu aller plus loin et vérifier que l'automate permettait de trier des cellules de manière contrôlée et reproductible. En effet le travail sur la capture et la libération des cellules, ainsi que le greffage des billes ne sont pas assez avancés pour réaliser ces expériences. Cependant le démonstrateur répond parfaitement au cahier des charges dans la mesure où il permet d'automatiser toutes les étapes du tri.

Nous avons utilisé l'automate dans différentes situations afin de prendre conscience de ses points forts et des axes d'amélioration. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'efficacité du plateau tournant ainsi qu'à la préparation de l'automate avant le déroulement automatique de toutes les étapes de tri.

### 4.3.1. Limitation de la perte des cellules dans les volumes morts

Pour tester l'utilité du plateau tournant j'ai réalisé l'expérience suivante :

- La seringue 1 est remplie avec une solution contenant des particules micrométriques (les mêmes que celles utilisées dans le chapitre 2)
- La seringue 1 est connectée à la zone de séparation et à la seringue 4 (cf. Figure 4-3) puis montée dans l'automate
- La suspension de particules effectue cinq allers-retours (durée : 40 min) dans la colonne de séparation (qui ne contient aucune bille), entre les seringues 1 et 4. Le débit de l'écoulement  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ce débit est choisi de telle sorte que la vitesse dans la colonne de séparation soit du même ordre de grandeur que dans les expériences du chapitre 2 ( $0,5 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ )
- J'ai testé 2 conditions :
  - sans plateau tournant : la colonne reste horizontale
  - avec plateau tournant : la colonne est verticale au moment du passage de la suspension d'une seringue à l'autre. Et entre chaque passage le plateau effectue une rotation de  $180^\circ$  de sorte que la seringue qui se vide soit au-dessus de la seringue qui se remplit (comme cela est programmé pour la capture de cellules)

La concentration en particules dans la suspension est mesurée par densité optique avant et après les cinq allers-retours. Lorsque la colonne reste horizontale, 40% des particules sont perdues à l'issue des allers-retours. Lorsque la colonne est verticale et change de sens, 15% des particules sont perdues. Le plateau tournant permet bien de limiter la perte des particules et cela renforce notre hypothèse selon laquelle la perte des particules dans le dispositif est liée à la sédimentation des particules sur les parois des tubes.

Nous avons réfléchi à comment nous affranchir du plateau tournant, avec pour objectif de simplifier à terme l'automate. Nous nous plaçons dans le cas où une particule est immobile sur la paroi d'un tube. Elle subit quatre forces comme cela est représenté en Figure 4-7 : son poids apparent  $F_g$  (dans une solution aqueuse), une force normale de la paroi  $F_n$ , une force visqueuse liée à l'écoulement du fluide qui tend à la mettre en mouvement  $F_d$ , et une force de frottements statiques qui tend à garder la particule immobile  $F_f$ .

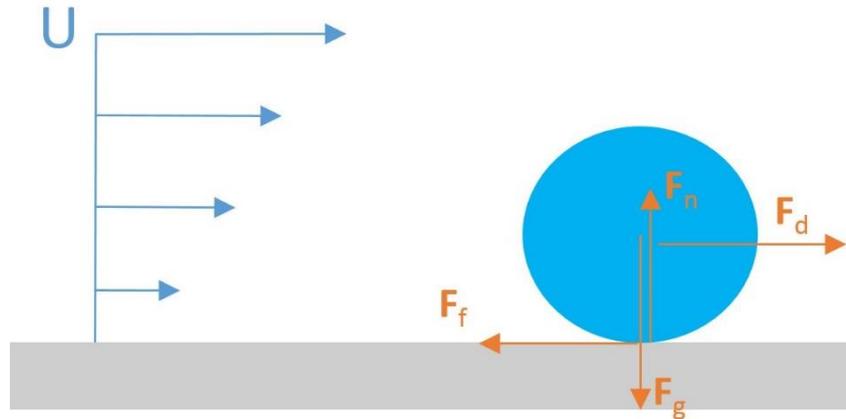


Figure 4-7 : Représentation schématique des forces s'exerçant sur une particule immobilisée sur la paroi d'un tube dans lequel un fluide s'écoule à la vitesse moyenne  $U$ . La particule subit une force liée à son poids apparent dans le fluide  $F_g$ , une force de réaction normale de la paroi du tube  $F_n$ , une force de frottements statiques avec la paroi  $F_f$  et une force de cisaillement due à l'écoulement qui est exprimée de manière globale par  $F_d$  (mais elle s'applique en réalité sur toute la paroi de la particule)

L'équilibre entre la force de frottements statiques et la force visqueuse détermine si la particule est en mouvement ou immobile. D'après le modèle empirique de Coulomb la particule est mise en mouvement lorsque :

$$F_d - \vartheta * F_g = 0 \quad (4-1)$$

avec  $\vartheta$  le coefficient de friction statique. Un article de Loiseleux et al<sup>1</sup> décrit théoriquement cette situation et aboutit à la conclusion que la particule est mise en mouvement lorsque :

$$\frac{\mu * \gamma}{(\rho_p - \rho_f) * g * D} > \frac{\vartheta}{15 * \Psi} \quad (4-2)$$

avec  $\mu$  la viscosité dynamique,  $\gamma$  le taux de cisaillement  $\frac{U}{R}$  ( $U$  la vitesse maximale de l'écoulement, et  $R$  le rayon de la colonne),  $\rho_p$  la masse volumique des particules,  $\rho_f$  la masse volumique du fluide,  $g$  l'accélération normale de pesanteur,  $D$  le diamètre des particules,  $\Psi$  un facteur correctif lorsque le nombre de Reynolds est important. En ajustant le taux de cisaillement  $\frac{U}{R}$  dans les tubes nous pouvons donc nous placer dans une situation où les particules sont toujours en mouvement :

$$R < \frac{15 * \mu * U * \Psi}{(\rho_p - \rho_f) * g * D * \vartheta} \quad (4-3)$$

Les coefficients de friction sont généralement compris entre 0,004 et 1 selon les matériaux en jeu. Si nous faisons le calcul correspondant à l'expérience réalisée ci-dessus pour les particules, avec un coefficient de friction de 1 le tube doit avoir un rayon inférieur à 0,8 mm. D'après ce calcul les particules immobilisées sur les parois sont à la limite d'être remises en suspension.

Pour une vitesse de  $5.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$  et des cellules de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre, si nous nous plaçons dans le cas le plus défavorable avec un coefficient de friction de 1 le tube doit avoir un rayon inférieur à 1,8 mm,

ce qui est tout à fait raisonnable. Actuellement les tubes utilisés dans l'automate ont un rayon de 0,8 mm, cela est donc suffisant pour s'assurer que les cellules restent en suspension.

Le plateau tournant remplit bien sa fonction et limite la perte des particules dans les volumes morts de l'automate. Cependant utiliser le cisaillement de l'écoulement pour maintenir les cellules en suspension en jouant sur le diamètre interne des tubes est une solution intéressante à développer. Le raisonnement ci-dessus fait des hypothèses concernant notamment la valeur du coefficient de friction statique. Afin de déterminer le diamètre de tube optimal il faudra faire le test expérimentalement. Cela permettra notamment de vérifier la toxicité du cisaillement sur les cellules.

#### 4.3.2. Montage des seringues, pousse-seringues et zone de séparation

La préparation des seringues, de la colonne et leurs connexions est une étape fonctionnelle mais elle est compliquée à mettre en œuvre. Dans un contexte de recherche et d'optimisation du protocole de tri ce n'est pas limitant, mais il est intéressant d'identifier les points critiques. Cela permettra de simplifier les versions futures.

La complexité vient principalement de deux choses, l'utilisation des seringues et pousse-seringues, ainsi que la présence de filtres des deux côtés de la colonne.

Le montage du circuit fluide de l'automate est grandement compliqué par la présence des filtres de part et d'autre de la colonne. Les deux filtres sont nécessaires si la suspension fait des allers-retours dans la colonne (sinon un seul suffit). Or la suspension peut passer dans la colonne plusieurs fois sans faire des allers-retours mais en circuit fermé. Dans le chapitre 2 nous avons constaté que la capture des particules sur les billes d'alginate est dissymétrique. Dans ce cas-là les allers-retours présentent l'intérêt d'utiliser toute la surface des billes pour la capture. Mais si la surface de capture est limitante, une solution est d'allonger la longueur de la colonne contenant les billes. De plus le fait d'aller toujours dans le même sens limiterait le problème de volume mort d'environ 200 $\mu$ L entre les seringues 1 et 4, et la colonne (zone signalée par les pointillés en Figure 4-3). Selon le volume initial de la suspension cellulaire ce volume mort n'est pas négligeable.

La préparation de l'automate nécessite de remplir les seringues et les tubulures avec les différentes solutions puis de les connecter ensemble. Un problème récurrent est la présence de bulles d'air dans le montage fluide. Leur élimination est fastidieuse et prend du temps. De plus pour les éliminer il est nécessaire de faire couler du liquide hors des seringues et des tubes ou bien de les secouer. Une des solutions peut contenir des cellules humaines issues d'un prélèvement biologique (sanguin par exemple), et il n'est pas envisageable d'un point de vue hygiène et sécurité que cette suspension

déborde et coule hors de la seringue. L'utilisation d'autres types de contenants pourrait simplifier cette étape de préparation.

#### 4.4. Conclusion

L'objectif initial était de développer un automate nous permettant d'optimiser le processus de tri. Le démonstrateur développé par Bertin Technologies répond au cahier des charges en permettant d'automatiser toutes les étapes du tri. Le premier objectif est atteint. Le second objectif est de trier des cellules et d'optimiser le protocole. Cela sera possible lorsque le travail sur la fonctionnalisation des billes et la libération des cellules sera plus mature.

L'utilisation de l'automate et notre compréhension des mécanismes de capture nous amènent à proposer les modifications suivantes. La présence de filtres de chaque côté de la colonne est une source de complexité dont on peut s'affranchir. Le plateau tournant permet bien de limiter la perte des particules dans les volumes morts. Cependant c'est une solution compliquée et coûteuse à mettre en place au niveau de l'automate. L'ajustement du diamètre des tubes est une méthode envisageable pour pallier à ce problème, en modulant la force de cisaillement sur les cellules afin de les maintenir en suspension. Une réflexion sur les consommables et leurs mises en place pourrait être menée. Ce retour d'expérience permettra je l'espère de simplifier une version ultérieure de l'automate.

#### 4.5. Bibliographie

1. Loiseleux, T., Gondret, P., Rabaud, M. & Doppler, D. Onset of erosion and avalanche for an inclined granular bed sheared by a continuous laminar flow. *Phys. Fluids* **17**, 103304 (2005).

---

## Conclusion générale

---

Aujourd'hui un des points clés dans le développement de la médecine régénérative est la transposition des protocoles développés au laboratoire en processus industriel. La mise en place de méthodes de culture, de congélation-décongélation, de tri, de mise en forme de cellules à grande échelle est un challenge. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la chromatographie cellulaire d'affinité qui est une méthode prometteuse en termes de tri cellulaire à grande échelle. Elle est cependant absente des solutions de tri dans le milieu médical et de la recherche.

L'enjeu de cette thèse a été de développer une compréhension des mécanismes gouvernant la capture spécifique des cellules dans une colonne chromatographique dans le but de l'utiliser pour des applications médicales à grande échelle. Historiquement cette technique a été étudiée dans le contexte de l'adhésion cellulaire. La description portait donc principalement sur l'étape de formation du lien spécifique lorsque la cellule et la surface de capture sont suffisamment proches pour interagir. Cependant cette description néglige totalement la première étape de transport des cellules à proximité de la surface. Nous avons donc choisi de nous intéresser au processus de capture dans son ensemble et nous nous sommes particulièrement attachés à décrire les phénomènes d'association. La force de notre approche réside dans notre démarche expérimentale nous permettant d'évaluer l'importance de chacune des étapes dans la cinétique globale de capture. Notre étude se plaçant dans un contexte d'application pour le domaine médical, nous avons pris en compte dès le début des contraintes comme la biocompatibilité et la non toxicité des matériaux et produits utilisés. En particulier nous avons choisi d'utiliser des billes composées d'alginate.

Dans un premier temps nous avons développé une expérience nous permettant d'étudier l'étape de transport amenant les cellules près de la surface des billes. Nous avons mesuré les taux de capture de particules micrométriques par des billes d'alginate en fonction de la vitesse d'écoulement et de la taille des billes. Avec l'aide de la théorie de la filtration colloïdale (CFT) ces mesures nous ont permis d'évaluer et d'identifier les mécanismes intervenant dans le transport, en particulier le rôle prépondérant de la sédimentation dans la capture.

Nous avons ensuite étudié la capture spécifique. Nous avons utilisé des cellules marquées naturellement, les globules rouges. Comme pour l'étude du transport nous avons étudié la cinétique de capture en fonction de la vitesse d'écoulement des cellules. Là encore l'efficacité de capture diminue lorsque la vitesse augmente. L'analyse de nos données expérimentales montre qu'il existe un premier régime où le transport gouverne la cinétique de capture spécifique des cellules. Puis lorsque

la vitesse d'écoulement augmente on constate que l'efficacité de capture diminue de manière beaucoup plus importante que ce qui est prévu par le modèle de transport de Tufenkji. Toutes les collisions n'aboutissent donc pas à une capture. L'étape de formation du lien devient cinétiquement limitante lorsque la vitesse de l'écoulement augmente.

Si on replace ces résultats dans un contexte appliqué, il est important de noter que dans une gamme de vitesses le transport gouverne la capture spécifique. En se plaçant dans cette gamme nous avons réfléchi au dimensionnement de la colonne et au protocole optimal en se basant sur les prédictions des efficacités de capture de Tufenkji. Nous constatons qu'il est envisageable de trier des cellules à des échelles aussi importantes que celles qui pourraient être en jeu avec le développement de la médecine régénérative ( $10^{12}$  cellules). Notre expérience au laboratoire, avec une colonne de l'ordre du centimètre, nous permet déjà de capturer des quantités de cellules compatibles avec certaines applications médicales comme la greffe de CSH ( $10^6$  cellules).

Afin d'aller plus loin dans la mise au point du protocole de tri nous avons réfléchi avec Bertin Technologies au développement d'un automate. L'objectif était de mettre au point un démonstrateur réalisant le processus complet, de la capture à la libération des cellules, de manière contrôlée et reproductible. Bertin Technologies a mis au point un automate réalisant toutes les étapes du tri. Lorsque la fonctionnalisation des billes et la libération des cellules seront plus avancées nous pourrons utiliser cet automate afin de travailler sur l'optimisation du protocole global de tri cellulaire.

Au départ nous avons l'intuition que la chromatographie d'affinité à partir de billes d'alginate était une technique de tri pertinente en particulier dans le contexte des biothérapies. Grâce à cette thèse nous sommes maintenant convaincus que c'est une solution prometteuse qu'il faut continuer à explorer. En parallèle du travail sur les mécanismes de capture spécifique d'autres aspects doivent maintenant être étudiés. En premier lieu il faut se pencher sur le matériau permettant la capture. En plus d'interagir spécifiquement avec les cellules d'intérêt il doit limiter l'adhésion non spécifique avec les cellules afin d'assurer la pureté de la population triée. L'alginate est un matériau très intéressant, cependant comme nous l'avons vu dans le troisième chapitre sa fonctionnalisation est compliquée. Il faut continuer l'optimisation. Pour libérer les cellules capturées différentes solutions sont envisageables : la décomplexation du gel d'alginate, l'application d'une force de cisaillement grâce à écoulement, ou bien l'utilisation d'enzymes clivant l'alginate ou les anticorps.

En conclusion, conceptuellement le tri cellulaire par chromatographie d'affinité pour des applications cliniques à grande échelle est validé. L'enjeu à relever aujourd'hui pour amener cette technologie à un développement industriel se trouve autour du matériau composant les billes.

## Annexes

### Annexe A : Détails sur les mesures expérimentales de détermination de la constante d'association des particules et des billes d'alginate

A posteriori nous vérifions les hypothèses que nous avons faites pour déterminer  $k_{on}$  expérimentalement.

La première hypothèse concerne la concentration en particules libres dans la zone où la mesure de  $I_{AB}$  est réalisée. Nous estimons la concentration en particules libres dans cette zone par  $C_{PLO}$ . Nous devons donc vérifier que dans cette zone la capture de particules est négligeable par rapport à leur apport par convection :

$$z_1 \ll \frac{U_P}{k_{on}} \quad (12)$$

Le Tableau 2 donne les valeurs de  $z_1$  et de la longueur caractéristique  $\frac{U_P}{k_{on}}$  pour chaque expérience.

| Expérience  | $z_1$ cm | $\frac{U_P}{k_{on}}$ cm |
|---|----------|-------------------------|
| Expériences en fonction de la vitesse d'écoulement U          |          |                         |
| 8 mm.s <sup>-1</sup>  | 0,3      | 1141                    |
| 2 mm.s <sup>-1</sup>  | 0,2      | 120                     |
| 0,3 mm.s <sup>-1</sup>  | 0,3      | 69                      |
| 0,07 mm.s <sup>-1</sup>                                       | 0,3      | 12                      |
| Expériences en fonction du diamètre des billes R <sub>B</sub> |          |                         |
| 971 μm  | 0,7      | 75                      |
| 722 μm  | 0,3      | 62                      |
| 305 μm (R1)   | 0,3      | 15                      |
| Autres expériences  |          |                         |
| Expérience sur un temps long                                  | 0,3      | 11                      |
| R2  | 0,3      | 11                      |
| R3  | 0,2      | 12                      |

Tableau 2 : Tableau donnant la longueur caractéristique  $\frac{U_P}{k_{on}}$  et la valeur de  $z_1$  (qui indique là où la mesure a été effectuée, cf. Figure 2-13) pour chaque expérience présentée.

Nous constatons que dans tous les cas la condition (1) est vérifiée.

La seconde hypothèse concerne le taux d'occupation des particules sur les billes d'alginate. Le nombre de particules capturées par unité de volume de colonne est  $C_{PC} * (1 - \phi)$  avec  $\phi$  la fraction volumique en billes et  $C_{PC}$  la concentration en particules capturées. La surface de particules capturées  $S_P$  par unité de volume de colonne est donc égale à :

$$S_P = C_{PC} * (1 - \phi) * \pi * R_P^2 \quad (13)$$

Expérimentalement nous mesurons  $C_{PL0}$  et  $C_{PT}$  la somme des particules capturées et libres. Dans la zone de l'empilement où nous effectuons la mesure la concentration en particules libres est égale à la concentration en particules en amont de l'empilement  $C_{PL0}$  (nous venons de le vérifier dans le paragraphe précédent). Nous pouvons donc écrire :

$$S_P = (C_{PT} - C_{PL0}) * (1 - \phi) * \pi * R_P^2 \quad (14)$$

Nous calculons  $S_P$  à la fin de chaque expérience de capture. La surface de billes disponible par unité de volume de colonne est donnée par la formule suivante :

$$S_B = \frac{\phi}{\frac{4}{3} * \pi * R_B^3} * 4 * \pi * R_B^2 \quad (15)$$

Dans Tableau 3 nous donnons le rapport  $S_P$  sur  $S_B$  pour chaque expérience.

| Expériences   | Proportion de surface occupée par les particules capturées sur les billes d'alginate |
|---|--|
| Expériences en fonction de la vitesse d'écoulement U          |  |
| 8 mm.s <sup>-1</sup>  | 0,4 %  |
| 2 mm.s <sup>-1</sup>  | 2%   |
| 0,3 mm.s <sup>-1</sup>  | 1%   |
| 0,07 mm.s <sup>-1</sup>                                       | 0,6%   |
| Expériences en fonction du diamètre des billes R <sub>B</sub> |  |
| 971 μm  | 1%   |
| 722 μm  | 0,8%   |
| 305 μm (R1)   | 3%   |
| Autres expériences  |  |
| Expérience sur un temps long                                  | 3%   |
| R2  | 3%   |
| R3  | 1%   |

Tableau 3 : Tableau donnant le pourcentage de surface occupée par les particules capturées sur les billes d'alginate pour chaque expérience présentée.

Nous constatons que dans tous les cas la surface occupée par les particules capturées est négligeable par rapport à la surface libre de billes d'alginate.

La dernière hypothèse concerne le taux de dissociation. Nous faisons l'hypothèse que le taux de dissociation est négligeable par rapport au taux d'association pendant la capture :

$$k_{on} * C_{PL}(z) \gg k_{off} * C_{PC}(t, z) \quad (16)$$

Dans la zone où nous avons effectué la mesure nous pouvons considérer que la concentration en particules libres est égale à la concentration en particules libres en amont de l'empilement. Nous pouvons donc réécrire l'équation (5) de la manière suivante:

$$k_{on} * C_{PL0} \gg k_{off} * (C_{PT} - C_{PL0}) \quad (17)$$

Pour chaque expérience nous connaissons  $C_{PL0}$ ,  $C_{PT}$ , et nous avons calculé  $k_{on}$ . Nous prenons la valeur de  $C_{PT}$  à la fin de l'expérience. Pour la valeur de constante de dissociation  $k_{off}$  nous avons déterminé sa borne maximale. D'après la formule de Bell<sup>1</sup>  $k_{off}$  est une fonction croissante de la force appliquée sur les particules. Dans notre cas c'est la force de cisaillement due à l'écoulement, qui est proportionnelle à  $\frac{U_p}{L_p}$  avec  $U_p$  la vitesse de l'écoulement dans les pores et  $L_p$  la taille caractéristique d'un pore. Nous connaissons la vitesse d'écoulement dans les pores. La taille des pores est comprise entre 50  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$  selon la taille des billes<sup>2</sup>. Nous avons mesuré  $k_{off}$  au cours de l'expérience où le cisaillement est maximale (par rapport aux autres expériences) c'est à dire pour une vitesse  $U_p = 17 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  dans un empilement de billes de 600 $\mu\text{m}$  de diamètre (cf. chapitre 2) :

$$k_{off} = 3.10^{-5} \text{ s}^{-1} \quad (18)$$

Nous pouvons donc considérer que la valeur de  $3.10^{-5} \text{ s}^{-1}$  est une borne maximale de la constante de dissociation. Le Tableau 4 donne les valeurs des taux d'association et de dissociation pour toutes les expériences présentées.

| Expériences   | Taux d'association<br>particules.mL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup><br>$k_{on} * C_{PL0}$ | Taux de dissociation maximum<br>particules.mL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup><br>$k_{off} * (C_{PT} - C_{PL0})$ |
|---|--|--|
| Expériences en fonction de la vitesse d'écoulement U          |  |  |
| 8 mm.s <sup>-1</sup>  | 5.10 <sup>4</sup>  | 2.10 <sup>3</sup>  |
| 2 mm.s <sup>-1</sup>  | 9.10 <sup>4</sup>  | 4.10 <sup>3</sup>  |
| 0,3 mm.s <sup>-1</sup>  | 3.10 <sup>4</sup>  | 2.10 <sup>3</sup>  |
| 0,07 mm.s <sup>-1</sup>                                       | 2.10 <sup>4</sup>  | 1.10 <sup>3</sup>  |
| Expériences en fonction du diamètre des billes R <sub>b</sub> |  |  |
| 971 μm  | 2.10 <sup>4</sup>  | 1.10 <sup>3</sup>  |
| 722 μm  | 3.10 <sup>4</sup>  | 2.10 <sup>3</sup>  |
| 305 μm (R1)   | 1.10 <sup>5</sup>  | 1.10 <sup>4</sup>  |
| Autres expériences  |  |  |
| Expérience sur un temps long<br>(cf. Figure 2-16)             | 1.10 <sup>5</sup>  | 1.10 <sup>4</sup>  |
| R2  | 1.10 <sup>5</sup>  | 8.10 <sup>3</sup>  |
| R3  | 1.10 <sup>5</sup>  | 1.10 <sup>4</sup>  |

Tableau 4 : Tableau donnant le taux d'association et le taux de dissociation pour chaque expérience présentée. Le taux de dissociation est estimé à partir d'une valeur maximale de koff, et de la concentration en particules capturées à la fin de l'expérience.

Pour toutes les expériences le taux de dissociation est 10 fois moins important que le taux d'association. Notre hypothèse est donc vérifiée.

En conclusion, lors de toutes les expériences la mesure est effectuée dans une zone de l'empilement où la concentration en particules libres est égale à C<sub>PL0</sub>, la surface occupée par les particules capturées est négligeable par rapport à la surface de billes libre, et le taux de dissociation est petit devant le taux d'association. Cela valide les mesures de constante d'association k<sub>on</sub> que nous avons effectuées.

Afin d'estimer l'incertitude de notre mesure de constante d'association, nous avons réalisé trois expériences dans les mêmes conditions. Ces expériences sont notées R1, R2, R3 dans le Tableau 2, Tableau 3, Tableau 4, Tableau 5. Les billes d'alginate ont un diamètre de 305 μm, la vitesse d'écoulement U est de 3.10<sup>-2</sup> cm.s<sup>-1</sup>, la concentration en particules libres en amont de l'empilement est de 2.10<sup>7</sup> particules.mL<sup>-1</sup>. Le Tableau 5 montre les 3 constantes d'association, la moyenne et l'écart type associés.

|  | R1                  | R2                  | R3                  | Moyenne             | Ecart type        |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Constante d'association<br>$k_{on} s^{-1}$ | $5,5 \cdot 10^{-3}$ | $7,2 \cdot 10^{-3}$ | $6,7 \cdot 10^{-3}$ | $6,5 \cdot 10^{-3}$ | $8 \cdot 10^{-4}$ |

Tableau 5 : Valeurs expérimentales des constantes d'association pour trois expériences réalisées dans les mêmes conditions.

Nous considérons donc que les mesures réalisées avec notre montage expérimental ont une erreur de mesure de l'ordre de 10% de la valeur mesurée.

1. Bell, G. I. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *Science* **200**, 618–627 (1978).
2. Nolan, G. T. & Kavanagh, P. E. The size distribution of interstices in random packings of spheres. *Powder Technol.* **78**, 231–238 (1994).

## Annexe B : Détails sur les mesures expérimentales de détermination de la constante d'association des globules rouges et des billes de verre

Sur le même principe que pour la capture des particules par les billes d'alginate nous allons vérifier les hypothèses faites pour la mesure des constantes d'association.

Les valeurs de  $z_1$  et de la longueur caractéristique  $\frac{U_P}{k_{on}}$  sont résumées dans le Tableau 6.

| Vitesse de l'écoulement $U \text{ m.s}^{-1}$ | $z_1 \text{ cm}$ | $\frac{U_P}{k_{on}} \text{ cm}$ |
|--|------------------|---------------------------------|
| $4 \cdot 10^{-4}$                            | 0,06             | 0,6                             |
| $7 \cdot 10^{-4}$                            | 0,15             | 1,7                             |
| $9 \cdot 10^{-3}$                            | 0,25             | 72                              |

Tableau 6 : Tableau donnant la longueur caractéristique  $\frac{U_P}{k_{on}}$  et la valeur de  $z_1$  (qui indique là où la mesure a été effectuée, cf. Figure 2-13) pour chaque expérience présentée.

L'hypothèse permettant d'estimer la concentration en globules rouges dans l'empilement de billes par la concentration en globules rouges en amont des billes est bien vérifiée:

$$z_1 \ll \frac{U_P}{k_{on}} \quad (4-4)$$

Concernant la constante de dissociation nous avons déterminé une borne maximale de  $k_{off}$  en la mesurant pour un taux de cisaillement supérieur au taux de cisaillement en vigueur lors des expériences présentées:

$$k_{off} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Le Tableau 7 donne les valeurs des taux d'association et de dissociation pour toutes les expériences.

| Vitesse de l'écoulement $U \text{ m.s}^{-1}$ | Taux d'association<br>cellules.mL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup><br>$k_{on} * C_{GR0}$ | Taux de dissociation maximum<br>cellules.mL <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup><br>$k_{off} * (C_{GRT} - C_{GR0})$ |
|--|--|---|
| $4.10^{-4}$                                  | $5.10^5$   | $3.10^4$  |
| $7.10^{-4}$                                  | $9.10^5$   | $4.10^4$  |
| $9.10^{-3}$                                  | $9.10^5$   | $4.10^4$  |

Tableau 7 : Tableau donnant le taux d'association et le taux de dissociation pour chaque expérience présentée. Le taux de dissociation est estimé à partir d'une valeur maximale de  $k_{off}$ , et de la concentration en globules rouges capturés à la fin de l'expérience.

On constate que le taux de dissociation est 10 à 20 fois moins important que le taux d'association.

Nous pouvons donc négliger les phénomènes dissociation pour déterminer  $k_{on}$ .

---

# Protocoles

---

## Composition du tampon utilisé lors des expériences de capture des particules par les billes d'alginate

Mélanger :

- 500 mL d'eau ultra pure
- 1.2 g d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
- 0.25 g de CaCl<sub>2</sub>
- 0.6 g de NaCl
- Ajuster le pH à 7 avec de la soude

Juste avant l'expérience de capture :

- Ajouter 5 g d'albumine de serum bovin
- 500 µL de tween 20
- Filtrer sur un filtre 0,2 µm

## Protocole de greffage des billes de verre avec de la streptavidine

Nettoyage des billes de verre :

- Peser 350 mg de billes de verre (SiLibeads type S 100-200 my)
- Laver pendant 10 minutes aux ultrasons dans une solution nettoyante alcaline à 2% (VWR : 29870-360)
- Sécher à l'étuve à 70°C pendant 20 minutes
- Laver pendant 10 minutes aux ultrasons dans de l'acétone
- Sécher à l'étuve à 70°C pendant 20 minutes

Greffage de l'APTES :

- Mettre les billes dans 500 µL d'acétone
- Ajouter 50 µL de 3-Aminopropyl)triethoxysilane (Sigma Aldrich)
- Laisser réagir pendant 60 minutes sous agitation
- Laver 5 fois les billes avec de l'acétone
- Laver 5 fois les billes avec du tampon phosphate PBS (Sigma Aldrich P4417)

Greffage de la streptavidine :

- Mettre les billes dans 200 µL de de PBS (Sigma Aldrich P4417)
- Ajouter entre 0,4 µL et 50 µL de streptavidine (Sigma Aldrich S4762, 2 mg/mL dilué dans du PBS)
- Ajouter 25µL de PBS contenant 0,5mg de EDC (N-Ethyl-N'-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)

- Ajouter 25µL de PBS contenant 0,25mg de s-NHS (Hydroxy-2,5-dioxopyrrolidine-3-sulfonic acid sodium salt)
- Laisser réagir pendant 30 minutes sous agitation
- Laver 5 fois avec du PBS

### Protocole de greffage des globules rouges avec de la biotine

- Laver 3 fois  $100 \cdot 10^6$  globules rouges dans du tampon phosphate PBS stérile (Sigma Aldrich D8537)
- Diluer  $50 \cdot 10^6$  globules rouges dans 200 µL de PBS stérile
- Diluer 6 mg de biotin-PEG2000-NHS (Interchim WT9290) dans 500 µL de PBS stérile
- Mélanger la solution de biotine et la solution de globules rouges
- Laisser réagir pendant 60 minutes sur un agitateur rotatif
- Laver 5 fois dans 15 mL de PBS stérile + 0,1 % en masse d'albumine de serum bovin

Lavage : centrifugation 10 minutes à 400g.

### Protocole de marquage des globules rouges avec des anticorps anti-glycophorine A+B

- Laver 3 fois  $100 \cdot 10^6$  globules rouges dans du tampon phosphate PBS stérile (Sigma Aldrich D8537)
- Diluer  $30 \cdot 10^6$  globules rouges dans 10 mL de PBS stérile
- Diluer 2 µL d'anticorps anti-glycophorine A+B (Abcam ab93548) dans 24 µL de PBS stérile
- Prélever 8 µL de la solution d'anticorps et les ajouter à la suspension cellulaire
- Laisser réagir pendant 30 minutes à 4°C (agiter à la moitié)

### Composition du tampon utilisé lors de la capture des globules rouges par les billes de verre

PBS stérile (Sigma Aldrich D8537) auquel est ajoutée 0,1 % en masse d'albumine de sérum bovin