



HAL
open science

Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante

Manon Giraud

► **To cite this version:**

Manon Giraud. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante. Autre [cond-mat.other]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS344 . tel-02420798

HAL Id: tel-02420798

<https://theses.hal.science/tel-02420798>

Submitted on 20 Dec 2019

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

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

Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à L'université Paris-Sud,
au Service de Physique de l'Etat Condensé et
Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, CEA

École doctorale n°564 Physique en Île-de-France (EDPIF)
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 21 novembre 2019, par

MANON GIRAUD

Composition du Jury :

Anne-Marie Haghiri-Gosnet Directeur de Recherche CNRS, Center of Nanosciences and Nanotechnologies, Palaiseau	Présidente
Julian Carrey Professeur, Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets, Toulouse	Rapporteur
Jean Baudry Directeur de Recherche, École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, Paris	Rapporteur
Paulo Freitas Professeur, International Iberian Nanotechnology Laboratory, Braga	Examineur
Jean-Michel Siaugue Maître de conférences, Physicochimie des Électrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux, Paris	Examineur
Guénaëlle Jasmin-Lebras Ingénieur-Chercheur CEA, Service de Physique de l'Etat Condensé, Gif-sur-Yvette	Co-encadrante
Cécile Féraudet-Tarisse Ingénieur-Chercheur CEA, Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, Gif-sur-Yvette	Co-encadrante
Stéphanie Simon Directrice de Recherche CEA, Service de Pharmacologie et Immunoanalyse, Gif-sur-Yvette	Directrice de thèse

Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante

Manon GIRAUD

1^{er} octobre 2016 – 30 novembre 2019

Remerciements

C'est avec reconnaissance et une pointe de tristesse que je conclus ma thèse au sein des Laboratoire de Nanomagnétisme et Oxyde (LNO) et Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse (LERI). Ces trois années ont été passionnantes et m'ont fait bénéficier d'un environnement très agréable grâce à l'ensemble des personnes de ces deux structures.

Ainsi, j'aimerais remercier en premier lieu le SPEC (Service de Physique de l'Etat Condensé) et son directeur François Daviaud et le SPI (Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse) et son directeur Christophe Juneau pour leur accueil. De même, merci à Claude Fermon, Michel Viret et Stéphanie Simon de m'avoir ouvert les portes de leurs groupes.

Je tiens également à remercier Stéphanie Simon pour sa direction au sein du LERI. Ses conseils francs et les pistes de réflexion suggérées ont toujours permis de grands pas en avant pour le projet. Son art de la formulation et sa précision scientifique ont nettement amélioré ce manuscrit. Merci beaucoup. Merci également pour son grand soutien, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Claude Fermon a dirigé cette thèse au sein du LNO. Ses grandes compétences en magnétisme et électronique ont été précieuses pour le projet, qu'il en soit remercié. Merci aussi à lui d'avoir proposé des idées originales, comme le capteur deux étages.

Je remercie les membres du jury (Jean Baudry, Julian Carrey, Anne-Marie Haghiri, Jean Michel Siaugue et Paulo Freitas) pour le temps consacré à mon travail et les nombreuses discussions intéressantes qui en ont découlé. Leurs remarques constructives et les questions soulevées vont permettre d'améliorer le dispositif dans la suite du projet.

Je tiens tout particulièrement à remercier Guénaëlle Jasmin-Lebras, mon encadrante au sein du LNO, pour m'avoir confié ce sujet si riche et pour avoir veillé à m'offrir d'excellentes conditions de travail. Je lui exprime toute ma gratitude pour m'avoir fait profiter de ses compétences en magnétisme, pour son implication et son enthousiasme dans ce projet. Son encadrement, me permettant de mettre en œuvre mes propres idées, m'a guidée vers plus d'autonomie dans mon travail. Je la remercie pour ses corrections méticuleuses et détaillées qui ont amélioré grandement ce manuscrit. Mille mercis également pour sa gentillesse et son soutien exceptionnels.

Cécile Féraudet-Tarisse a fait preuve d'une pédagogie rare dans son encadrement au sein du LERI. Sa grande efficacité, ses compétences scientifiques multiples, sa rigueur, son énergie, son enthousiasme et sa bonne humeur communicative ont été des atouts importants pour moi. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir ouvert une fenêtre sur le monde passionnant de l'immunoanalyse et de m'avoir tant soutenue tout au long de ces trois années. Merci infiniment.

Il m'est impossible d'oublier toute l'aide apportée par François-Damien Delapierre lors de son post-doctorat au sein du LNO. Ses compétences en microfluidique et ses idées novatrices ont grandement contribué aux avancées du projet tandis que son humour et son dynamisme ont rendu ces trois années plus agréables encore.

Ma gratitude aussi à Pierre Bonville pour toute son aide en programmation et en magnétisme. Sa patience, sa pédagogie et sa méthode rigoureuse ont accéléré nos avancées tandis que sa jovialité a rendu ces heures passées ensemble très agréables.

Tous mes remerciements à Aurélie Solignac pour ses multiples contributions au projet, sur le plan fon-

damental de compréhension des phénomènes, sur le plan pratique de ma formation et de réalisations directes (dépôt des couches, recuit sous champ), mais aussi sur le plan des conseils et des idées qu'elle a proposés pour l'avancée du projet. Enfin, sur le plan humain, sa disponibilité, sa gentillesse et sa patience ont été un grand soutien pour moi pendant ces trois années.

Pour sa grande disponibilité, un grand merci à Anne Wuijkhuizen qui a réalisé de nombreuses expériences de cytométrie en flux pour ma thèse, s'est impliquée dans la relecture de mon travail et dans ma formation à la culture cellulaire. Elle a de plus toujours pris le temps de répondre de façon pédagogue et approfondie à mes questions.

Sur ma dernière année de thèse sont arrivés au SPEC Mathieu Thévenin et Frédéric Coneggo qui ont beaucoup apporté en termes d'électronique, d'acquisition et de traitement des données. Un grand merci à eux pour leur implication et leurs innovations qui continuent à se mettre en place.

Myriam Pannetier-Lecoeur a également proposé de nombreuses idées pour l'amélioration de notre dispositif et a été très à l'écoute sur toutes sortes de problématiques liées à ma thèse. Elle a aussi contribué à améliorer mes présentations orales à plusieurs reprises. Un grand merci à elle.

Merci à Céline Goulard-Huet d'avoir effectué des tests de fonctionnalisation des particules. De même, merci à Julie Dano, Nathalie Morel, Hervé Volland et Karla Perez-Toralla d'avoir toujours pris le temps de m'aider et de répondre à mes interrogations de physicienne dans un laboratoire de biologie avec beaucoup de bienveillance. Merci à l'ensemble des personnes du LERI pour leur accueil.

J'adresse tous mes remerciements à tous ceux qui se sont impliqués ponctuellement dans le projet : Dana Stanescu, Anne Forget, Marco Bonetti, Cécile Wiertel-Gasquet, et Dominique Marce.

Pour son soutien personnel et dans les tâches administratives merci beaucoup à Corinne Kopec-Coelho. Merci également à Nathalie Royer. Pour sa grande aide en informatique, tous mes remerciements à Philippe Girault.

Pour la conception et fabrication de pièces mécaniques, un grand merci à Grégory Cannie, Gérald Le-Goff et Dominique Duet. Pour la fabrication des capteurs et leur découpe, merci à Elodie Paul et Sébastien Delprat.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui m'ont formée à diverses techniques au sein des deux laboratoires et qui ont pris le temps de répondre à mes questions : Marc Plaisance, Quentin Baratte, Karine Moreau, Stéphanie Gelhaye, Anita Bouget, Pierre-François Orfila, Claudine Chaleil, Elodie Paul, Roland Turbot, Nadine Genand-Riondet, Jean-Baptiste Moussy et Nathalie Morel.

Un grand merci à Florent Mallogi du LIONS, Anne-Marie Haghiri-Gosnet et Antoine Pallandre du C2N pour leur temps et leurs conseils sur la microfluidique.

Je remercie aussi le laboratoire Phenix, particulièrement Emilie Secret, Christine Ménager, Aude Michel et Jean-Michel Siaugue pour leur aide dans les problématiques d'agrégation des billes magnétiques et leur engagement à continuer dans cette voie.

J'adresse tous mes remerciements à Eric Ezan, Olivier Limousin et la DGA, représentée par Rose-Marie Sauvage, pour l'intérêt manifesté pour notre projet et leur soutien.

L'équipe du SPEC et l'ensemble des stagiaires, thésards et post-docs, (Jean-Yves, Dorothée, Elodie, Grégory, Cyril, Sylvain, Michel, Patrice, Grégoire, Jean-Baptiste, Romain, Nathanaël, Laurence, Victoria, Mathieu, Mathilde, Vincent, Xavier, Fawaz, Anaëlle, Julien, Chloé, Théophile, Samson, Paul, Daniela, Ludovic, Adel, Maïkane, Reina, Andrin, Jacob, Josué, Olivier...) ont participé à l'ambiance très agréable qui règne dans ce laboratoire. Un grand merci à eux.

Enfin, je tiens à remercier Matthias, Flavie, Aurélien et mes parents pour leur immense et constant soutien, m'offrant les meilleures conditions pour effectuer cette thèse (entre autres...).

Abbréviations utilisées

Adem200	Billes magnétiques Adembeads de 200 nm de diamètre. (Carboxyl-Adembeads 0212, Ademtech).
ASSURED	« Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users ». Critères de développement de tests de diagnostic terrains définis par l’OMS.
BSA	L’albumine sérique bovine (en anglais « Bovine Serum Albumin »).
Chemi50	Billes magnétiques de 50 nm de diamètre. (fluidMAG-ARA 4115, Chemicell GmbH).
CHO	Lignée cellulaire choisie pour notre modèle non spécifique. (« Chinese Hamster Ovary cells »), achat chez ECACC (Wiltshire, UK).
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (« Dynamic Light Scattering » en anglais). Cette technique permet de mesurer la distribution en taille d’objets en suspension dans une solution.
Dyna1	Billes magnétiques Dynabead de 1 µm de diamètre. (Dynabeads® MyOne Streptavidine T1 (65601), Invitrogen).
Dyna1-anti-CD138	Dyna1 fonctionnalisée par des anticorps anti-CD138.
Dyna1-IpaD315	Dyna1 fonctionnalisée par des anticorps IpaD315.
Dyna2.8	Billes magnétiques Dynabead de 2.8 µm de diamètre. (Dynabeads® M-280 Tosylactivated (14203), Invitrogen).
ELISA	Méthode immuno-enzymatique (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »).
GMR	Magnétorésistance géante (« Giant MagnetoResistance » en anglais).
LOC	Laboratoire sur puce (« Lab On Chip » en anglais).
LoD	Limite de détection (« Limit of Detection » en anglais).
LoQ	Limite de quantification (« Limit of Quantification » en anglais).
Micro50	Billes magnétiques de 50 nm de diamètre. (nanomag®-D-spio 79-19-501, Micromod Partikeltechnologie GmbH).
Micro500	Billes magnétiques de 500 nm de diamètre. (nanomag®-D 09-19-502, Micromod Partikeltechnologie GmbH).
Micro1.5	Billes magnétiques de 1.5 µm de diamètre. (sicastar®-M 39-19-153, Micromod Partikeltechnologie GmbH).
MNP	Nanoparticule magnétique (« Magnetic NanoParticle » en anglais).
MP	Particule magnétique (« Magnetic Particle » en anglais).
MR	Magnétorésistance.
NS1	Lignée cellulaire choisie pour notre modèle biologique. Ces cellules sont issue de lymphocytes B de souris. (n° ATCC TIB-18), dérivées de la lignée P3X63Ag8 (n° ATCC TIB-9).
PCB	Circuit imprimé (« Printed Circuit Board » en anglais).
PDMS	Polydiméthylsiloxane, plastique moulable couramment utilisé en microfluidique.
POC	Outils de diagnostic terrains, (dits « Point of Care » en anglais).
RTN	Bruit (magnétique) télégraphique (« Random Telegraphic Noise » en anglais).
SNR	Ratio signal sur bruit (« Signal to Noise Ratio » en anglais).
TMR	Magnétorésistance à effet tunnel (« Tunnel MagnetoRestistance » en anglais).
VSM	Magnétomètre à échantillon vibrant (« Vibrating Sample Magnetometer » en anglais).

Sommaire

Introduction	1
0.1 Biocapteurs magnétiques sur format papier	7
0.2 Biocapteurs magnétiques statiques sur puce	8
0.3 Biocapteurs magnétiques dynamiques sur puce	10
0.4 Objectifs de la thèse	11
1 Principe de détection de la biopuce	13
1.1 Aimantation des matériaux	13
1.1.1 Diamagnétisme	13
1.1.2 Paramagnétisme	13
1.1.3 Ferromagnétisme	14
1.1.4 Antiferromagnétisme	15
1.1.5 Superparamagnétisme	15
1.2 Capteurs à magnéto-résistance géante	15
1.2.1 Principe de l'effet GMR	16
1.2.2 Vanne de spin	16
1.2.3 Composition et géométrie des capteurs	17
1.2.4 Performances	18
1.3 Description d'un laboratoire sur puce à base de capteurs GMR	21
1.4 Conclusion	22
2 Caractérisation des marqueurs magnétiques	23
2.1 Propriétés magnétiques des billes	23
2.1.1 Propriétés générales	23
2.1.2 Description du VSM	23
2.1.3 Principe d'une mesure d'aimantation en fonction du champ	24
2.1.4 Résultats obtenus	24
2.2 Fonctionnalisation des billes	25
2.2.1 Vérification de la fonctionnalisation par la diffusion dynamique de la lumière	26
2.2.2 Vérification de la fonctionnalisation par un test bandelette	27
2.2.3 Vérification de la fonctionnalisation par la cytométrie en flux	28
2.3 Comportement des billes dans les suspensions biologiques	30
2.3.1 Cinétique d'immunocapture avec différents types de billes	30
2.3.2 Agrégation des billes	31
2.3.3 Bilan des expériences précédentes et choix des billes	32
2.3.4 Détermination de la concentration appropriée en billes pour l'immunocapture	35
2.3.5 Labélisation dans différents milieux	36
2.4 Conclusion	37

3	Simulations numériques et modélisation	39
3.1	Simulation du passage d'un objet	39
3.1.1	Billes seules	39
3.1.2	Agrégats	44
3.1.3	Cellules	46
3.1.4	Bilan des simulations des trois objets	47
3.2	Géométrie adoptée	48
3.2.1	Bilan des simulations	48
3.2.2	Modélisation du passage des objets	49
3.3	Conclusion	52
4	Expériences	53
4.1	Préparation du matériel	53
4.1.1	Production des laboratoires sur puces	53
4.1.2	Culture cellulaire	57
4.1.3	Fonctionnalisation des billes magnétiques	58
4.1.4	Préparation de sérum et de plasma de lapin	59
4.2	Optimisations du laboratoire sur puce	59
4.2.1	Système fluïdique	60
4.2.2	Aimant et hauteur des canaux	60
4.2.3	Conclusions des expériences préliminaires	60
4.2.4	Plan d'expériences	61
4.3	Déroulé d'une expérience	62
4.3.1	Préparation des échantillons	62
4.3.2	Montage expérimental	63
4.4	Tests de comparaison	66
4.4.1	Tests immunochromatographiques, dits tests bandelette	66
4.4.2	Test sandwich ELISA	67
4.4.3	Cytométrie en flux	68
4.5	Conclusion	69
5	Résultats et discussion	71
5.1	Traitement des données	71
5.1.1	Repérage initial des pics	71
5.1.2	Améliorations du tri et extraction des données	72
5.1.3	Ajustements	73
5.2	Résultats pour les puces un étage	74
5.2.1	Résumé des expériences en PBS	74
5.2.2	Autres milieux	78
5.2.3	Utilisation de deux capteurs	79
5.3	Comparaison avec méthodes courantes de diagnostic	81
5.3.1	Test Bandelette	81
5.3.2	Cytométrie en flux	81
5.3.3	Sandwich ELISA	82
5.4	Discussion	83

6	Capteur deux étages	87
6.1	Fabrication	87
6.1.1	Dépôt des couches GMR	88
6.1.2	Fabrication des capteurs	88
6.1.3	Montage du dispositif deux étages	89
6.1.4	Caractérisation en fin de fabrication	90
6.2	Simulations	90
6.2.1	Principe	90
6.2.2	Etude théorique sur le capteur deux étages	91
6.2.3	Simulation du flux	91
6.2.4	Programme d'ajustements des signaux réels	92
6.3	Résumé des expériences	94
6.4	Résultats	95
6.5	Discussion	98
	Conclusion	99

Introduction

De nombreuses maladies comme le cancer du sein ou la septicémie sont encore mal diagnostiquées chez certains patients ou le sont trop tard pour permettre aux traitements d'être efficaces [1–5]. Or, l'établissement d'un diagnostic précis et juste améliore la santé du patient en lui permettant une meilleure prise en charge [6]. D'autre part, les conséquences d'un diagnostic tardif peuvent être dramatiques dans certains cas, entraînant la mort du patient [7,8], des lésions à vie, ou la propagation d'épidémies [9]. Le diagnostic est établi, la plupart du temps, selon un tableau clinique des symptômes observés, ou simplement à l'occasion d'un examen de routine. Des analyses complémentaires sont généralement requises. Certaines s'appuient sur de l'imagerie (diagnostic « *in vivo* ») et d'autres sur du diagnostic en laboratoire (« *in vitro* »). En 2016, selon une étude sur les pratiques médicales en Allemagne et aux Etats-Unis, ces tests *in vitro* ont été sollicités pour l'établissement de 66% des diagnostics [10].

Les tests de diagnostic *in vitro* sont réalisés sur des échantillons prélevés sur le patient et analysés en laboratoire. Il peut s'agir de l'histologie sur des coupes de tissus, des cultures cellulaires suivies d'analyses chimiques ou biochimiques, de la numération de formule sanguine, ou encore de la détection/quantification de biomarqueurs. Pour qu'un analyte (par exemple un fragment d'acide nucléique ou une protéine) soit reconnu comme un biomarqueur il doit être spécifique d'une pathologie ou d'un état physiologique précis et doit pouvoir être mesuré d'une façon spécifique, fiable et reproductible à des concentrations pertinentes [11]. Des banques de données répertoriant différents biomarqueurs d'une maladie [12, 13] sont enrichies en parallèle du développement de technologies d'analyse et ces deux avancées participent ensemble à l'amélioration des dispositifs médicaux pour le diagnostic *in vitro*.

En effet, tout diagnostic moléculaire s'appuie sur la reconnaissance spécifique d'une cible (le biomarqueur) par une sonde biologique. Il existe différents couples cible/sonde possibles : enzyme/substrat, acide nucléique/acide nucléique, acide nucléique ou protéine/aptamère et anticorps/antigène principalement qui ont chacun des niveaux de spécificité et des constantes de réaction différents. Ainsi, le choix de l'analyte et de sa sonde biologique a une grande influence sur les performances du test de diagnostic.

Dans cette thèse, nous nous intéressons aux tests immunologiques (reposant sur le couple antigène/anticorps), qui restent parmi les plus utilisés et développés actuellement. Contrairement aux tests reposant sur l'information génétique (détermination de mutations par exemple), les approches phénotypiques s'intéressent directement aux produits d'expression des gènes ou de leur régulation (protéines). Les tests immunologiques sont des tests phénotypiques qui permettent la détection et la quantification de biomarqueurs en général protéiques.

Les antigènes sont des molécules reconnues par l'organisme comme appartenant au non-soi et provoquant une réaction immunitaire, ce sont généralement des protéines ou des polysaccharides. L'anticorps (Ac) est une glycoprotéine sécrétée par les cellules du système immunitaire (lymphocytes B) en réponse à la présence d'un antigène qu'il reconnaît spécifiquement. La région de reconnaissance par l'anticorps à la surface de l'antigène s'appelle l'épitope. La liaison d'un anticorps à sa cible est non covalente et son affinité, définie comme la « force » de la liaison, résulte de ce fait d'un équilibre permanent entre son association et sa dissociation. Cette affinité varie en fonction du milieu dans lequel elle s'exerce et des forces l'influençant (force ionique, pH, forces de Van der Waals, etc. . .). Elle se calcule comme le rapport des vitesses de dissociation et d'association et varie entre 10^9 et 10^{12} mol/L [14]. La Fig.1 présente des schémas de ces molécules. Un anticorps est formé

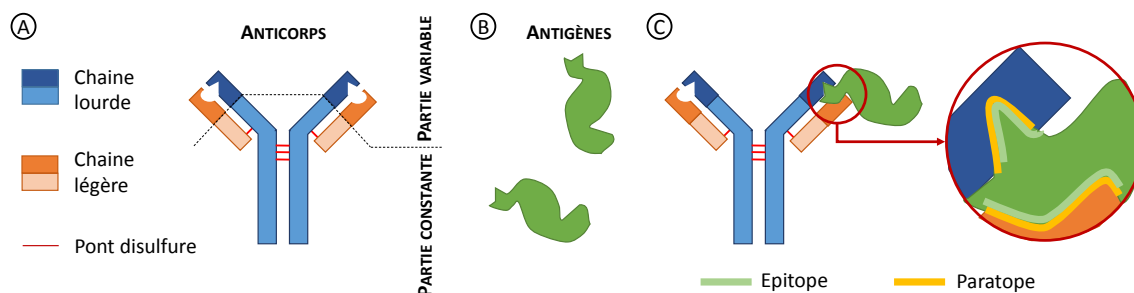


FIGURE 1 – A) Schéma d'un anticorps avec ses 2 chaînes longues, 2 chaînes courtes composées chacune d'une partie constante et d'une partie variable. B) Schéma de l'antigène correspondant. C) Schéma du complexe antigène-anticorps présentant les épitope et paratope.

de 4 parties : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne a une partie constante et une partie variable. La partie constante est commune à tous les anticorps de même isotype. Il existe 5 isotypes principaux nommés IgG, IgA, IgM, IgD et IgE, dont certains, comme les IgG, sont divisés en sous-classes. La partie variable contient le paratope de l'anticorps, c'est-à-dire la partie à l'origine de la reconnaissance spécifique d'un épitope de l'antigène. Dans les tests immunologiques, des anticorps poly ou monoclonaux peuvent être utilisés. Les anticorps monoclonaux sont tous identiques et ciblent exactement le même épitope tandis que les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps ciblant tous le même antigène mais par des épitopes distincts.

D'autre part, et quel que soit le couple biomarqueur/sonde choisi, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini les critères ASSURED (« Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users ») pour que les chercheurs développent des outils de diagnostic terrains, dits « Point of Care (POC) » utilisables facilement par le plus grand nombre, capables de faire une vraie différence en termes de santé publique. Il s'agit de développer des tests bons marché, sensibles, spécifiques, simples d'utilisation, rapides, robustes, ne nécessitant pas d'équipement supplémentaires et transportables [15]. Ces critères s'appliquent bien au cahier des charges des tests dont l'armée française a besoin sur le terrain comme le prouve le projet de création de l'EMIBE (Elément Mobile d'Intervention Biologique et Epidémiologique) [9]. Par ailleurs, pour le confort du patient, et dans la mesure du possible il est primordial de privilégier le développement des tests les moins invasifs. C'est particulièrement important pour ceux qui doivent être réalisés régulièrement dans le cas du suivi du malade [16], ou pour les tests de dépistage, pratiqués sur une grande partie de la population [17]. Une façon de répondre à cette exigence est de réduire les volumes d'échantillon nécessaires à l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

Pour toutes ces raisons les tests POC, réalisés sur le terrain (par des primo-intervenants, ou dans des pays ne disposant pas des infrastructures et personnels médicaux nécessaires à la réalisation de tests de laboratoire) ou dans les cabinets médicaux sont d'un grand intérêt.

Aujourd'hui, les tests POC les plus aboutis sont immunochromatographiques, appelés aussi tests « bandelette » dont le plus emblématique est probablement le test de grossesse, vendu depuis 1984 [18]. Il est le test « POC » par excellence, le plus simple et le moins cher. La bandelette est constituée de trois zones (voir Fig.2) : un tampon de dépôt, (où les échantillons sont déposés), une membrane de migration en nitrocellulose et un tampon absorbant en haut de la membrane, qui agit comme une pompe et aspire le liquide. La détection est réalisée en « sandwich » c'est-à-dire que les analytes d'intérêt sont fixés à une première sonde attachée à la nitrocellulose, afin de permettre l'identification de la nature de l'objet détecté grâce à sa position, et à une seconde sonde liée à un marqueur (typiquement de l'or colloïdal) destiné à émettre un signal détectable. Tout test bandelette contient au moins deux sites de reconnaissance : la ligne test, fixant l'analyte d'intérêt et la ligne

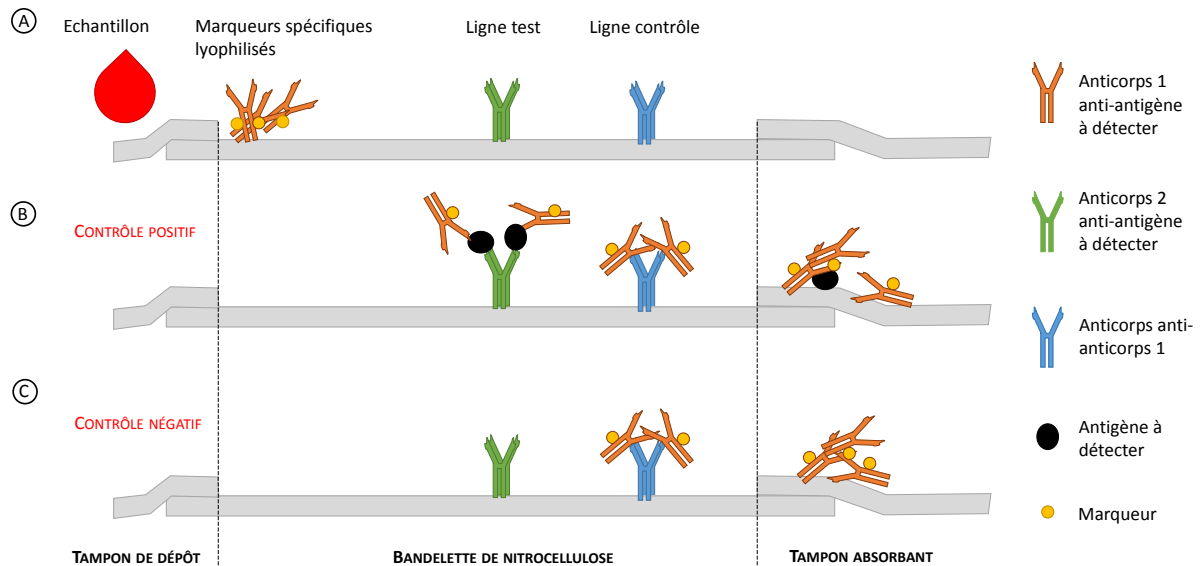


FIGURE 2 – Principe du test bandelette. Le test est positif si la ligne test et la ligne contrôle apparaissent, il est négatif si seule la ligne contrôle apparaît. Sans apparition de la ligne contrôle, le test n'a pas fonctionné et doit être refait.

contrôle fixant le marqueur et permettant de s'assurer du bon fonctionnement du test, que son résultat se révèle positif ou négatif. Les tests bandelette reposent majoritairement sur des méthodes de détection optiques bien que quelques exemples de tests électrochimiques se développent [19].

Avec l'essor des techniques de microfabrication et plus particulièrement de la microfluidique, des laboratoires sur puce (« lab on a chip » ou LOC) ont vu le jour, intégrant toutes les étapes d'un test, de la collection de l'échantillon à l'interprétation des résultats. En effet, la manipulation de liquides à l'échelle du nano ou même du picolitre permet i) une diminution des volumes d'échantillons et de réactifs utilisés, ii) une meilleure sensibilité, iii) un meilleur contrôle du flux, iv) une meilleure intégration et v) une transportabilité accrue. De nouveaux tests POC, utilisant ces LOC pour intégrer des biocapteurs, ont alors émergé. Ils reposent majoritairement sur des systèmes de détection optique (spectrophotométrie, fluorescence, chimiluminescence, interférométrie ou encore la mesure de plasmons de surface) ou électrochimique (ampérométrie, impédance ou potentiométrie) [19–21]. Parmi eux, on peut distinguer deux modes d'utilisation appelés dans la suite du chapitre respectivement les « microréseaux » et les « microcytomètres ». Les microréseaux détectent la présence d'une cible fixe dans leur voisinage tandis que les microcytomètres détectent une cible en mouvement. De nombreuses sous-catégories de ces dispositifs existent et le tableau que nous dressons ici n'est pas exhaustif.

Les microréseaux sont constitués d'un maillage de capteurs qui sont fonctionnalisés en surface par des sondes biologiques. Lors du passage d'un échantillon, la fixation de la cible biologique par la sonde entraîne une variation locale de propriétés optiques ou électrochimiques (directement ou par l'intermédiaire de marqueurs) [22–24]. La détection est miniaturisée par l'utilisation de capteurs CCD ou CMOS pour les mesures optiques [22] ou d'électrodes micrométriques pour les mesures électrochimiques.

Les microcytomètres permettent de détecter en flux des objets biologiques d'intérêt parmi une large population. Classiquement, l'échantillon est concentré en un flux étroit avant de passer devant un LASER. L'analyse de la lumière diffusée dans l'axe donne la taille des objets observés tandis que la lumière diffusée à 90° renseigne sur leur granulosité/structure. Grâce à ces deux informations, la population majoritaire d'intérêt est repérée. D'autre part, à 90°, l'appareil mesure également la fluorescence émise par l'échantillon, ce qui permet de savoir si cette population d'intérêt a été capturée ou non par des marqueurs spécifiques fluorescents. De nouvelles méthodes de détections intégrées, plus adaptées aux tests POC, ont été développées dans les dernières années en utilisant notamment des diodes LASER [25–27] ou des mesures d'impédance [28, 29].

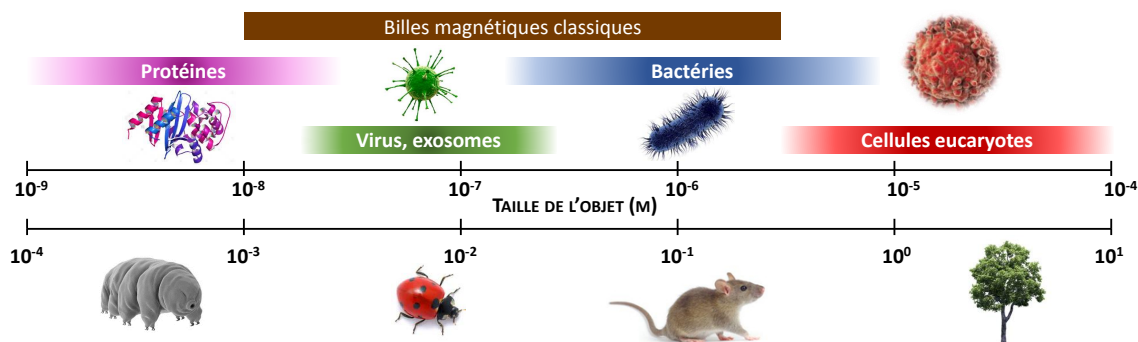


FIGURE 3 – Echelle du vivant. Une correspondance d'échelle entre les objets biologiques d'intérêt (cellules, virus, protéines) et des êtres vivants pluricellulaires est établie. La taille des billes magnétiques généralement utilisées pour marquer les échantillons biologiques est également indiquée.

Les avantages et inconvénients des tests POC de type bandelettes, microréseaux et microcytomètres sont présentés et comparés dans le Tableau 1 en précisant pour chacune le niveau de développement, les cibles biologiques et les matrices d'utilisation. En résumé, les tests bandelette sont les techniques de POC les plus pertinentes (les plus rapides, les moins chers et les plus simples à utiliser) mais manquent de sensibilité et de flexibilité pour certaines applications tandis que les microréseaux et microcytomètres restent des dispositifs assez chers et complexes qui doivent gagner en simplicité pour permettre leur utilisation dans les cabinets médicaux ou les laboratoires de terrain [19]. Parmi les microcytomètres et les microréseaux, les techniques optiques sont plus performantes (sensibilité, spécificité) que les techniques électrochimiques qui présentent l'avantage d'une plus grande intégrabilité et simplicité d'analyse [24].

Bien que les techniques de détection optiques et électrochimiques soient actuellement les deux plus développées, d'autres méthodes existent et sont très prometteuses pour la mise au point de nouveaux tests POC [20, 30]. Parmi elles, figurent les capteurs magnétiques qui vont nous intéresser particulièrement dans cette thèse. Ils présentent l'avantage de mesurer des propriétés ne provenant pas des objets biologiques eux-mêmes mais seulement de marqueurs magnétiques, ainsi, l'utilisation des matrices biologiques complexes n'affecte pas les mesures comme c'est le cas avec les méthodes optiques ou électrochimiques [31, 32]. On peut donc s'affranchir des étapes de lavage des échantillons en matrices complexes [33].

De plus, ces techniques sont potentiellement versatiles car seuls les marqueurs introduits (micro ou nanoparticules magnétiques fonctionnalisées), se liant spécifiquement à la cible d'intérêt, sont détectables. Les techniques magnétiques sont d'ailleurs largement employées dans le monde de la biologie et de la médecine (IRM, MEG, hyperthermie, séparation magnétiques) et la plupart de ces méthodes reposent sur l'utilisation de particules magnétiques. Ainsi, leurs propriétés ont été et continuent d'être développées dans ce but [31, 34–36], traçant la voie pour l'utilisation des capteurs magnétiques dans des dispositifs de diagnostic *in vitro*. Diverses compagnies, comme Chemicell, Micromod Partikeltechnologie GmbH, Ademtech ou ThermoFisher, offrent une large gamme de tailles (de quelques nanomètres à la dizaine de micromètres), de forme, de matériaux magnétiques, de matériaux de surface (silicium, métal, polymère, etc.) et de groupement de surface permettant le couplage avec toutes sortes de molécules actives (streptavidine, ion carboxylique, protéine G, etc.). La commercialisation de billes magnétiques adaptées aux différentes cibles d'intérêt (La Fig.3 présente les ordres de grandeurs des tailles des différents objets biologiques) rend possible l'essor des capteurs magnétiques pour la détection biologique.

Format	Niveau de développement	Cibles	Matrices	Avantages	Inconvénients	Références
Bandelette	Commercial	Antigènes Anticorps Enzymes Toxines Bactéries etc.	Plasma Sang Urine Salive etc.	Fonctionne sans électricité Résultats qualitatifs à l'œil nu Simple d'utilisation Peu cher Rapide (20 min) Ni prétraitement ni lavage	Quantitatif seulement avec un lecteur Reproductibilité Flexibilité limitée Nécessite une ligne contrôle Sensibilité	[19, 37–46]
Microréseaux optiques	En recherche	ADN Anticorps Antigènes	Sérum (parfois dilué)	Facile à utiliser Rapide (30 - 40 min) Haut débit Excellente capacité à multiplexer	Puces complexes et chères Lecteurs optiques encombrants Fonctionnalisation de surface nécessaire Etapas de lavages	[19, 20, 22]
Microréseaux électrochimiques	Commercial (ElectraSense)	ADN Anticorps Antigènes	Sérum (parfois dilué)	Facile à utiliser Rapide (30 - 40 min) Haut débit Excellente capacité à multiplexer	Puces complexes et chères Fonctionnalisation de surface nécessaire Etapas de lavages	[19, 23, 24, 47]
Microcytométrie	Commercial (Luminex)	Cellules Toxines	Sérum Lavement nasal Tampon Sang	Détection 1 par 1 Peu cher à l'utilisation Haut débit Excellente capacité à multiplexer	Haut prix d'achat Long Etapas de lavages Interprétation des résultats	[19, 25, 26, 29]

Tableau 1 – Comparaison des formats des tests POC en termes de niveau de développement, de cibles visées, de matrices testées. Les avantages et inconvénients de chacune des méthodes sont également listés.

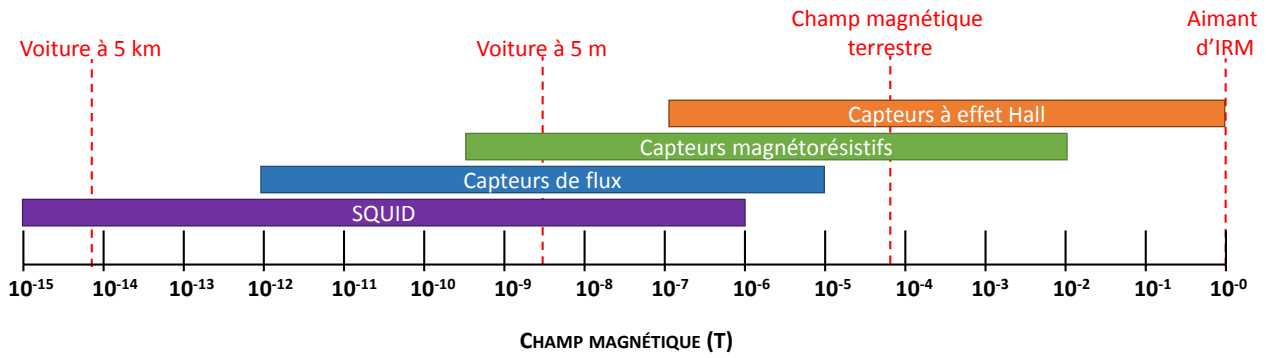


FIGURE 4 – Echelle des sensibilités des quatre types de capteurs magnétiques les plus utilisés. Quelques ordres de grandeur de champs magnétiques de la vie courante sont indiqués en rouge.

Au cours des 20 dernières années, différents groupes ont proposé des biocapteurs magnétiques pour du diagnostic *in vitro*. Les capteurs commercialisés les plus sensibles sont les SQUID (« superconducting quantum interference devices ») suivis par les magnétomètres à saturation dits « fluxgates » (voir Fig. 4). Quelques groupes ont proposé des dispositifs basés sur ces capteurs pour la détection d'objets biologiques [48–50]. En plus de leur grande sensibilité, l'avantage de ces capteurs est qu'ils peuvent être utilisés pour mesurer le temps de relaxation de particules magnétiques soumises à un champ alternatif (temps mis par ses particules pour trouver leur état d'équilibre après la modification du champ auquel elles sont soumises). Ces outils sont donc capables de différencier parmi une population homogène de billes celles qui sont attachées à une cible de celles qui sont libres en solution. Ainsi, malgré une utilisation en statique, aucune étape de lavage n'est nécessaire pour retirer les billes non accrochées [32]. Cependant, les SQUID présentent les inconvénients de fonctionner à basse température et de coûter cher (à l'achat mais aussi en hélium liquide nécessaire pour les refroidir). Les fluxgates sont plus adaptés à notre problématique et ont récemment été utilisés avec succès pour détecter des protéines C-réactives en moins de 30 minutes dans du sérum. Malgré cela, ces capteurs restent complexes et sont interfacés par des circuits électroniques volumineux [51].

D'autres capteurs magnétiques, particulièrement adaptés aux tests POC, présentent les mêmes avantages que les méthodes électrochimiques en termes d'intégrabilité et de simplicité d'analyse des résultats [32, 52]. Ils sont de plus, sensibles, peu coûteux, productibles en grande quantité, et de taille adaptable. Des mesures de résonance magnétique [53, 54], d'impédance magnétique [55], des mesures de champ dipolaires réalisées par des bobines, des capteurs à effet Hall [56] ou magnétorésistifs (essentiellement magnétorésistance à effet tunnel ou TMR et magnétorésistance géante ou GMR) [57] ont été proposées. Les bobines inductives, les capteurs à effet Hall et magnétorésistifs sont les plus utilisés car ils sont simples à produire, ils couvrent une gamme de sensibilité aux champs magnétiques compatible avec la détection de micro ou nanoparticules magnétiques à quelques micromètres de distance et l'analyse des signaux est directe et facile à interpréter [58–64].

Les principes de détection de ces trois types de capteurs sont différents. Les bobines sont des capteurs de flux c'est-à-dire qu'elles ne détectent pas les variations du champ magnétique mais celles de son flux (Φ) à travers leur surface selon la loi de Lenz-Faraday : $V_{Bobine} = \frac{d\Phi}{dt}$. Ainsi, sa sensibilité dépend directement de sa surface et de la fréquence des variations de champ. La miniaturisation d'un tel dispositif réduit donc ses performances. Pour la détection de sources locales de variation de champ, les capteurs de champ tels que les capteurs à effet Hall ou magnétorésistifs sont plus adaptés [61]. L'effet Hall se produit dans un conducteur électrique parcouru par un courant lorsqu'il est soumis à un champ magnétique orthogonal. Les charges électriques formant le courant sont alors déviées par le champ magnétique appliqué, générant une tension transverse proportionnelle au champ. L'avantage de cette détection est qu'elle est linéaire sur une large plage de champ. Cependant, sa sensibilité est inférieure à celle des capteurs magnétorésistifs (voir Fig. 4). L'effet magnétorésistif sera détaillé dans le Chapitre 1. Rapidement, il consiste à traduire une variation de champ en une variation de résistance électrique. En effet, ces dispositifs basés sur l'électronique de spin fonctionnent grâce à la propriété de spin-

dépendance de la conduction des matériaux ferromagnétiques (défini au Chapitre 1) dans lesquels les électrons ne rencontrent pas la même résistance selon l'orientation relative de leur spin et de l'aimantation du matériau. En superposant deux couches ferromagnétiques séparées par une couche non magnétique (pour les découpler) on obtient un dispositif dont la résistance dépend de l'orientation relative des deux couches ferromagnétiques, qui dépend du champ appliqué. Si la couche de séparation est un isolant, le passage du courant à travers cette couche se fait par effet tunnel et le dispositif est appelé magnétorésistance à effet tunnel (TMR). Si la couche de séparation est un conducteur, le dispositif est un capteur GMR. Les TMR ont une meilleure sensibilité que les GMR mais leur niveau de bruit à basse fréquence est plus élevé et leur production plus complexe. Dans cette thèse, nous avons choisi de travailler avec un capteur GMR.

Finalement, les performances des tests de diagnostic développés à partir de capteurs magnétiques dépendent, en plus du type de capteur et du type de sonde biologique, du format de ce test. Les différents dispositifs magnétiques peuvent être classés selon trois formats de tests :

- les tests bandelette
- les tests statiques sur puce
- les tests dynamiques sur puce

La suite de ce chapitre détaille chacun de ces formats et leur niveau de développement. Les résultats obtenus et les avantages et inconvénients de ces approches sont résumés dans le Tableau 2.

0.1 Biocapteurs magnétiques sur format papier

Ces tests ont un format bandelette et utilisent des particules magnétiques en tant que marqueur. La détection s'effectue, pour la plupart des dispositifs, après la migration de l'échantillon à l'aide d'un lecteur magnétique [65, 66]. La nécessité d'un lecteur implique une étape supplémentaire de positionnement précis ou de balayage de la surface après la fin de la migration [64]. Les moyens de détection quantitative proposés incluent les capteurs magnétorésistifs avec et sans contact et les bobines inductives, sans contact [65–67].

D'autres modèles de détection magnétique ont également été développés, permettant une détection en temps réel, au cours de la migration de l'échantillon dans la nitrocellulose. Une première approche a consisté à suivre la mesure différentielle au cours du temps entre deux capteurs hybrides (effet Hall et magnétorésistif). Le capteur de référence est placé en amont de la bande test, et l'autre au niveau de la bande test. L'augmentation du signal à proximité de la bande test au cours du temps montre son enrichissement progressif en billes [68]. Un deuxième système utilisant des capteurs magnétorésistifs en contact avec la bandelette a été proposé. Un capteur est positionné en amont et un autre en aval de la bande test. La mesure des deux capteurs pendant l'avancée du front de migration du liquide permet alors d'estimer la perte en particules magnétiques entre les zones de détections, correspondant à la quantité de particules fixées par la bande test [69]. Les performances de ces tests n'ont toutefois pas encore été comparés au test bandelette standard utilisant l'or colloïdal.

Pour conclure, les tests bandelette magnétiques sont encore au stade de la recherche et peu d'études ont été réalisées en matrice biologique jusqu'à présent. Les prochains objectifs sont de donner une réponse quantitative, rapide avec une meilleure sensibilité que celle des tests à détection optique actuels. Une des limites de cette méthode, provient cependant de leur format bandelette et de la difficulté de les adapter à des cibles volumineuses comme les cellules eucaryotes ou certaines bactéries (comme les formes sporulées de certaines bactéries gram(+)). En effet, ces systèmes reposent sur la migration des objets à détecter dans la nitrocellulose, sa porosité doit donc être adaptée à la taille de la cible. Or, plus la porosité de ces bandelettes est importante et plus les échantillons migrent rapidement, réduisant d'autant le temps de contact entre la cible et le marqueur et donc l'intensité du signal sur la bande test. Trouver le compromis n'est pas toujours aisé pour les cibles volumineuses pour lesquels d'autres formats sont envisagés.

0.2 Biocapteurs magnétiques statiques sur puce

Diverses puces microfluidiques pour mesures magnétiques statiques ont été développées, suivant le même principe que les microréseaux optiques ou électrochimiques. La formation de sandwich entre la surface du capteur magnétique et un marqueur magnétique permet une mesure quantitative de la concentration en un analyte. Ces mesures se font en champ magnétique statique, (associées à des étapes de lavage supprimant les particules non accrochées), ou alternatif [32].

Ces méthodes statiques présentent l'avantage de pouvoir multiplexer les mesures, il suffit alors de diviser la surface du capteur en zones qui sont chacune spécifique d'une cible différente [32, 62, 66, 70]. Cependant, la fonctionnalisation de surface n'est pas évidente et la diffusion des sondes dans les zones voisines peut entraîner l'enregistrement de signaux non spécifiques [28, 71]. D'autre part la difficulté de réaliser cette étape sur des dispositifs commerciaux devant être stables dans le temps et offrir des performances robustes est à prendre en compte [70].

Parmi les capteurs utilisés, les GMR [72, 73] et les capteurs à effet Hall sont majoritaires. Les dispositifs magnétorésistifs ont été utilisés dans trois configurations différentes. La première consiste à faire passer l'échantillon en un flux continu tandis que les variations de résistance du capteur sont enregistrées et comparées à celui d'un autre capteur non fonctionnalisé, l'ensemble étant soumis à un champ extérieur constant, orthogonal au plan des capteurs. La soustraction des deux signaux supprime l'effet des interactions non spécifiques se produisant à la surface des deux capteurs et permet une visualisation dynamique de la fixation de la cible par la sonde. Une deuxième méthode utilise le même principe de soustraction et la même configuration mais en utilisant un seul capteur. L'enregistrement commence lors du passage de tampon et continue à l'injection de l'échantillon dans la puce. Dans cette méthode le flux est interrompu, permettant une incubation de quelques minutes avant l'étape de lavage, supprimant les accroches non spécifiques. La différence entre le signal de fin et le signal initial est proportionnel à la quantité d'analyte fixé [70]. Enfin, une troisième méthode utilise des excitations pulsées générées par des lignes de courant intégrées sous les capteurs. La mesure de la réponse des capteurs pendant et après l'excitation permet d'éliminer le bruit par soustraction des deux signaux si les mesures sont faites suffisamment rapidement pour que le bruit soit corrélé [74].

D'autres équipes ont développé des méthodes statiques avec des capteurs à effet Hall. En particulier, Min *et al.* ont présenté une puce microfluidique composée de 16 puits face à 16 capteurs à effet Hall. Après chargement de l'échantillon dans la puce, un champ permanent (H_{DC}), aimantant les billes magnétiques contenues dans chaque puits est appliqué. Un champ alternatif de fréquence et d'amplitude H_{AC} connues lui est superposé. Une détection synchrone permet alors d'extraire le signal dû aux particules magnétiques et de mesurer la variation de leur aimantation. Elle oscille à la fréquence appliquée entre ses valeurs d'équilibre correspondant aux champs $H_{DC} + H_{AC}$ et $H_{DC} - H_{AC}$. Ainsi, en balayant l'intensité du champ magnétique permanent, il est possible de reconstruire la courbe d'aimantation des billes (variation de l'aimantation des billes selon le champ imposé). Cette publication est particulièrement intéressante car elle ouvre la voie à une nouvelle façon de multiplexer les mesures magnétiques, sans s'appuyer sur la localisation des sondes [75]. Cette capacité a d'ailleurs été montrée sur un mélange de deux types de billes magnétiques dont les courbes de susceptibilité sont très différentes.

Les dispositifs de ce format continuent de se développer et de s'améliorer [74, 76]. La plupart n'ont cependant pas encore été testés en conditions réelles, dans des matrices biologiques complexes [70]. Quelques-uns, utilisant des capteurs magnétorésistifs, ont donné lieu à la création de start ups [77–79], visant respectivement le diagnostic de maladies cardiaques ou de cancer et la détection de contamination de lait par des bactéries pathogènes, démontrant la pertinence des mesures magnétiques dans le monde de l'immunoanalyse, et leur grande versatilité.

Leur limite est cependant celle de tout test sandwich : la surface des capteurs limite les mesures quantitatives à une gamme donnée de concentration.

Format	Capteur	Réf.	Analytes	Matrices	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
Bandelette	MPQ	[65]	Morphine Fentanyl Méthanphétamine	Urine	0,20 ng/mL 0,36 ng/mL 1,30 ng/mL 5,5 ng/mL 0,3 µg/mL 0,44 - 2,2 nM 5 10 ¹¹ /mL	Rapide (20 - 40 min) Multiplexable Simple d'utilisation Ni prétraitement ni lavage Peu cher Capteur réutilisable	Lecteur (positionnement précis) Reproductibilité (inhomogénéité des billes dans la bande test) Flexibilité limitée Capacité à multiplexer limitée
	GMR	[66]	hCG	PBST			
	TMR	[67]	hCG	Eau			
	AMR/Hall	[68]	cTnI	Non précisé			
	GMR	[69]	MNP (10 nm)	PBS			
Statique		[74]	MNP (15 nm)	Hexane	2,45 µT	Portable	Fonctionnalisation de surface
		[72]	SLPI	Non précisé	10 fM	Rapide (5 min - 2h)	Non spécificité
	GMR	[70]	MMP9	PBST	1 ng/mL	Quantitatif Multiplexage très facile	Plus cher que bandelette
Dynamique		[56]	CTC	Sang	Non estimée	Technique AC multiplexable	Plus cher que bandelette
	Hall	[80]	Bactérie Gram+	Tampon	10 bactéries	Haut débit (10 ⁷ cellules/min) Analyse simple des données	Lavages pour marquage Durée 70 min - 2.5 h Capacité à multiplexer limitée
Dynamique		[81]	<i>Streptococci</i>	Lait+PBST	100 cfu/mL	Haut débit possible	Faux positifs dus aux agrégats
	GMR	[33]	Cellules FaDu	Sang+EDTA	Non estimée	Analyse simple des données	Plus cher que bandelette
		[82]	Cellules RAW et Cellules NPC	MC	Non estimée	Technique AC multiplexable Pas de lavage	Durée (70 min - 2.5 h) Capacité à multiplexer limitée

Tableau 2 – Comparaison des tests POC magnétiques. Abréviations utilisées : Réf. : Références, MPQ : le « Magnetic Particle Quantifier » est un lecteur de test bandelette composé de bobines, hCG : l'hormone gonadotrophine chorionique est un biomarqueur de grossesse, cTnI : la troponine I est un biomarqueur cardiaque, SLPI : le « secretory leukocyte peptidase inhibitor » est un biomarqueur de cancer ovarien, MMP9 : « matrix metalloproteinase 9 » est un biomarqueur d'accident vasculaire cérébral, BCG : le *Bacillus Calmette-Guérin* est une bactérie modèle moins dangereuse en remplacement de la mycobactérie *tuberculosis*, les cellules FaDu sont une lignée cellulaire d'épithélium humain, les cellules RAW sont une lignée cellulaire de macrophages de souris, les cellules NPC sont une lignée cellulaire de cellules progénitrices neurales humaines, PBS : tampon phosphate salin est un tampon physiologique, PBST : PBS avec Tween20 (le Tween20 est un détergent), EDTA : l'éthylènediaminetétraacétique est utilisé ici comme un agent anticoagulant, MC : Milieu de culture cellulaire, MNP : nanoparticules magnétiques, cfu : unités formatrices de colonies.

0.3 Biocapteurs magnétiques dynamiques sur puce

Des dispositifs à détection dynamique, permettant de mesurer individuellement le signal de chaque objet magnétique, ont été développés par Loureiro *et al.* [83, 84]. Cette détection des objets magnétiques un par un ouvre de grandes perspectives en terme de sensibilité des tests de diagnostic [85]. Ces tests présentent l'avantage d'être faits en flux, sans étape de lavage, ouvrant la possibilité de la détection haut-débit. Cette méthode de détection dynamique d'objets biologiques consiste à fonctionnaliser des billes magnétiques avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la cible d'intérêt et de mélanger l'échantillon à analyser avec une quantité donnée de ces billes. Après incubation, l'échantillon est introduit dans la puce de test qui est composée d'un canal microfluidique collé au-dessus d'un capteur. Le passage des objets marqués induit des variations locales de champ que le capteur détecte. Une étude a montré qu'en ajoutant un champ alternatif, la détection pouvait être multiplexée avec des marqueurs dont les courbes d'aimantation sont très différentes [56]. Cependant, la grande majorité des travaux présentés, privilégiant la simplicité de l'instrumentation, sont en champ statique, donc non multiplexables. Ces tests ont été développés à base de capteurs GMR ou à effet Hall car ces capteurs fonctionnent à température ambiante, possèdent une instrumentation associée simple, ont un faible coût et un procédé de fabrication industrialisable. Parmi ces deux types de capteurs, le capteur GMR reste le plus utilisé car il a un meilleur rapport signal/bruit (SNR pour « Signal to Noise Ratio ») [32, 57].

Bien que cette approche permette effectivement la détection des objets biologiques un par un, sa sensibilité est limitée du fait de signaux faux positifs liés à la présence d'agrégats de billes magnétiques, confondus avec de vrais objets biologiques labélisés avec des billes magnétiques. En effet, afin de marquer correctement et rapidement (loi d'action de masse) les objets biologiques étudiés, les billes magnétiques sont introduites en excès. Dans le mélange, coexistent alors trois types d'objets magnétiques, les cibles biologiques marquées, les billes individuelles surnuméraires et d'éventuels agrégats de billes. La plupart des objets biologiques marqués ont un signal magnétique bien plus grand que celui des billes seules ou des agrégats. Cependant, comme le champ dipolaire détecté par le capteur diminue fortement avec la hauteur des objets magnétiques dans le canal (il est inversement proportionnel au cube de la hauteur de l'objet par rapport au capteur) [86], un agrégat ou une bille qui passe dans le bas du canal, tout près du capteur, peut donner un signal équivalent à celui d'un objet biologique marqué par plusieurs billes mais passant plus haut, loin du capteur. Ceci engendre un certain nombre de faux positifs parmi les signaux détectés.

Différentes solutions ont été envisagées pour lever ce verrou. La première idée est de concentrer l'échantillon dans une zone étroite proche du capteur par focalisation de flux [56, 80, 87]. Cette technique est efficace puisqu'elle maintient tous les objets à une même distance du capteur mais elle ajoute le besoin d'un deuxième flux (constitué de solution tampon) et de l'ajustement précis des deux flux. Une deuxième idée a été proposée pour attirer les objets magnétiques vers le bas du canal et supprimer tout flux. Les échantillons sont insérés dans la puce microfluidique sans aucun pompage et le fluide est laissé au repos, les objets sédimentent. La puce contient des bandes conductrices régulièrement espacées tout au long du canal dont les circuits sont ouverts ou fermés par des microcontrôleurs [88], les objets magnétiques sont alors attirés vers les lignes activées et se déplacent donc sans besoin de pompe ni de pousse-seringue. Les auteurs ont mis en évidence qu'un tel système permettait de séparer les bactéries labélisées des billes fonctionnalisées par un anticorps et des billes libres, ne faisant alors passer que le groupe des bactéries (le plus rapide) au-dessus du capteur GMR pour leur comptage. La technique a été évaluée positivement avec des bactéries *Escherichia Coli* mais elle ne permet pas de mesure continue, limitant son débit. D'autre part, la technique reposant sur un équilibre entre les forces de friction et les forces magnétiques, il convient de traiter la surface de ces puces avant utilisation, ce qui complique sa mise en œuvre. Enfin, une troisième méthode a été proposée. Il s'agit de combiner des gradients magnétiques avec des forces hydrodynamiques pour trier les objets selon leur taille et leur moment magnétique. Les gradients magnétiques sont induits par un aimant permanent sous la puce et relayés par des chevrons magnétiques de géométrie précise intégrés dans la puce tandis que les forces hydrodynamiques sont dues à la structure même de la puce [89]. Dans ce système, les dimensions du canal microfluidique ainsi que celles des chevrons ma-

gnétiques et leur disposition relative doivent être judicieusement calculés pour chaque cible. Le flux doit lui aussi être ajusté. Finalement, la méthode est très efficace, alignant les objets magnétiques au fond du canal en amont de leur passage au niveau du capteur GMR sur une large gamme de concentrations mais elle demeure peu pratique. D'autre part, elle n'a encore été testée que sur des modèles non biologiques (microparticules magnétiques). Ainsi, aucun dispositif dynamique n'a encore prouvé son applicabilité, bien que la méthode soit prometteuse [62, 64].

Dans cette thèse deux autres approches permettant de limiter le nombre de faux positifs et donc d'accroître la sensibilité, sans pour autant complexifier le dispositif et les mesures ont été développées.

0.4 Objectifs de la thèse

Cette thèse est consacrée au développement d'un test de diagnostic capable de détecter rapidement, de façon simple, sensible et spécifique, différents objets biologiques rares en réponse à un besoin d'urgence de diagnostic clinique et/ou de biosécurité. La méthode choisie est basée sur la combinaison d'un marquage spécifique en utilisant des anticorps et l'expertise dans le domaine du Laboratoire et Recherches en Immunoanalyse (LERI) avec des nanoparticules magnétiques et leur détection dynamique avec des capteurs à magnétorésistance géante (GMR) développés au Laboratoire Nanomagnétisme et Oxydes (LNO). Au cours de ces trois années nous avons développé notre outil en utilisant des cellules eucaryotes qui présentent l'avantage d'être de taille suffisante pour pouvoir être observées au microscope optique (5 – 20 μm). Dans la suite du projet, le test pourra être adapté à d'autres cibles, plus petites. Nous avons choisi comme modèle d'étude une lignée cellulaire facile à cultiver, non adhérente, bien caractérisée et présentant un marqueur antigénique connu à sa surface pour lequel des anticorps commerciaux sont disponibles. Ces cellules, appelées NS1 (n° ATCC TIB-18), sont issues de lymphocytes B de souris, et dérivées de la lignée P3X63Ag8 (n° ATCC TIB-9). Elles sont utilisées en routine dans les laboratoires pour la production d'hybridomes servant à la production d'anticorps monoclonaux après fusion avec des lymphocytes B de souris. Ces cellules expriment à leur surface la molécule CD138 (appelée aussi Syndecan-1) qui est une glycoprotéine transmembranaire, et l'antigène utilisé dans notre cas pour leur labélisation par des billes magnétiques. D'autre part, pour nos contrôles négatifs, nous avons choisi une deuxième lignée cellulaire facile à cultiver et bien caractérisée, ne présentant pas l'antigène CD138 : les cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary » cells). Ce sont des cellules épithéliales provenant d'ovaires de hamster chinois utilisées en routine dans les laboratoires pour synthétiser des protéines thérapeutiques. Elles ont été achetées chez ECACC (Wiltshire, UK).

Deux types de dispositifs ont été développés afin de limiter le nombre de faux positifs : la puce « un étage » (avec une rangée de capteurs au-dessous du canal) et la puce « deux étages » (avec une rangée de capteurs au-dessous et une au-dessus du canal). La majorité des résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus avec les puces un étage dans lequel le canal microfluidique est séparé des capteurs par une couche inerte de quelques micromètres, permettant de rendre une grosse partie des agrégats indétectables pour le capteur [90]. L'épaisseur de cette couche inerte a été déterminée par une approche théorique à l'aide de la modélisation du système à partir de données récoltées au cours d'expériences préliminaires. La contrepartie de cette technique simple est une diminution de la sensibilité du test, liée à la perte de la détection d'un certain nombre de cellules marquées. Les critères qui définissent la qualité d'un test de diagnostic comme la sensibilité, la spécificité, la répétabilité la robustesse mais aussi la rapidité et la facilité d'utilisation, ont été évalués pour ce dispositif. Dans le Chapitre 6, nous présentons la puce deux étages, plus complexe, composé de quatre séries de capteurs disposés de part et d'autre du canal microfluidique. Son avantage par rapport à la puce un étage est qu'elle devrait permettre de déterminer le nombre de billes que contient chaque objet détecté.

Nécessitant des connaissances transversales entre les domaines de la physique (microfabrication, magnétisme) et de la biologie (immunoanalyse), cette thèse a bénéficié de l'encadrement de deux laboratoires du CEA, le LNO et le LERI. Les objectifs étaient de concevoir un outil de diagnostic et de l'améliorer selon les critères

ASSURED. Pour cela, les approches physiques (modélisation du système et simulations, tests de fabrication en salle blanche, traitement des données, etc.) et biologiques (tests faisant varier les réactifs biologiques, les tampons, les concentrations, etc.) ont dues être menées en parallèle. La répétabilité/reproductibilité, critère important des tests de diagnostic, en a été complexifiée car elle a été impactée par la variabilité des puces conçues en plus des aspects biologiques pertinents. Afin d'évaluer correctement notre test, nous l'avons comparé à trois techniques de diagnostic immunologique classique : le test bandelette, le test ELISA et la cytométrie en flux sur le même modèle biologique.

Le **Chapitre 1** présente, après quelques rappels de magnétisme, la structure et le fonctionnement du capteur à magnétorésistance géante. En préambule du deuxième chapitre, le principe du marquage magnétique et les propriétés des marqueurs sont abordés.

Le **Chapitre 2** est consacré à l'étude du choix des billes magnétiques en tant que marqueurs dans notre étude. Les différents critères qui ont permis de les sélectionner sont décrits en détails.

Le **Chapitre 3** présente les différents paramètres qui interviennent dans nos expériences et la modélisation du système. Elle a guidé les choix expérimentaux, comme ceux de la géométrie du capteur et du canal microfluidique.

Le **Chapitre 4** donne les différents protocoles expérimentaux. La fabrication des puces, la culture des cellules et le matériel utilisé sont décrits en détails. Le protocole complet d'une expérience est expliqué, ainsi que les conditions précises des tests bandelette, ELISA et de cytométrie en flux utilisés à titre de comparaison sur notre modèle biologique.

Dans le **Chapitre 5** sont exposés les résultats obtenus avec la puce un étage. Le programme utilisé pour le traitement des données et la définition des critères de performance du test sont présentés. Certains des critères qui définissent un test de diagnostic comme la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et la vitesse de réalisation du test ont été évalués et comparés aux trois autres méthodes décrites dans le chapitre 4 (tests bandelette, ELISA et de cytométrie en flux).

Le **Chapitre 6** est consacré à la puce deux étages. Les différents essais de conception de ce dispositif sont décrits. Les performances attendues de ce test sont évaluées à l'aide de simulations. Enfin, quelques résultats des premiers tests effectués avec ce capteur deux étages sont présentés.

Chapitre 1

Principe de détection de la biopuce

Le laboratoire sur puce développé dans cette thèse est basé sur la détection de particules magnétiques grâce à des capteurs magnétorésistifs. Après une première partie, dans laquelle, sont rappelées quelques notions de magnétisme nous expliquerons le fonctionnement des capteurs à magnétorésistance géante (GMR) et décrivons leurs caractéristiques (sensibilité, bruit). Enfin, nous présenterons le laboratoire sur puce qui comporte les capteurs et un canal microfluidique.

1.1 Aimantation des matériaux

L'application d'un champ magnétique \vec{H} a pour effet d'aimanter les matériaux. L'aimantation résultante dépend des propriétés de ce matériau selon l'équation (1.1) où χ_m est la susceptibilité du matériau et μ_0 est la perméabilité du vide. Selon les types de matériaux, χ_m peut être un scalaire ou une matrice. L'aimantation du matériau et le champ appliqué contribuent tous deux au champ magnétique résultant \vec{B} selon l'équation (1.2). La variation de l'aimantation d'un matériau \vec{M} avec le champ appliqué \vec{H} se représente sous la forme d'une courbe d'aimantation.

$$\vec{M} = \chi_m \vec{H} \quad (1.1)$$

$$\vec{B} = \mu_0(1 + \chi_m)\vec{H} \quad (1.2)$$

1.1.1 Diamagnétisme

Lorsqu'un atome est soumis à un champ magnétique \vec{H} , le moment orbital des électrons autour du noyau est modifié pour s'opposer à l'effet du champ. Cet effet est linéaire et très faible. Dans la plupart des matériaux (eau, cuivre, argent, plastiques ...), il est le seul effet de l'application d'un champ. Ces matériaux sont dits diamagnétiques et sont caractérisés par une susceptibilité magnétique scalaire négative de l'ordre de -10^{-5} ou -10^{-6} . Si le champ \vec{H} est annulé, le matériau retrouve son aimantation nulle. Une courbe d'aimantation typique de matériaux diamagnétiques est représentée Fig. 1.1 A.

1.1.2 Paramagnétisme

Certains atomes ont des électrons non appariés (magnésium, calcium, sodium, tungstène et platine par exemple). Ils présentent donc un moment non nul qui s'oriente dans le champ magnétique extérieur créant ainsi une aimantation colinéaire avec le champ appliqué. De plus, une interaction d'échange entre ces moments existe qui, en dessous d'une certaine température, conduit à un ordre magnétique (ferromagnétique, ferrimagnétique ou antiferromagnétique). Au-dessus de cette température, les moments fluctuent et ces matériaux se caractérisent par une susceptibilité magnétique scalaire positive de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} . Si le champ \vec{H} est annulé, le

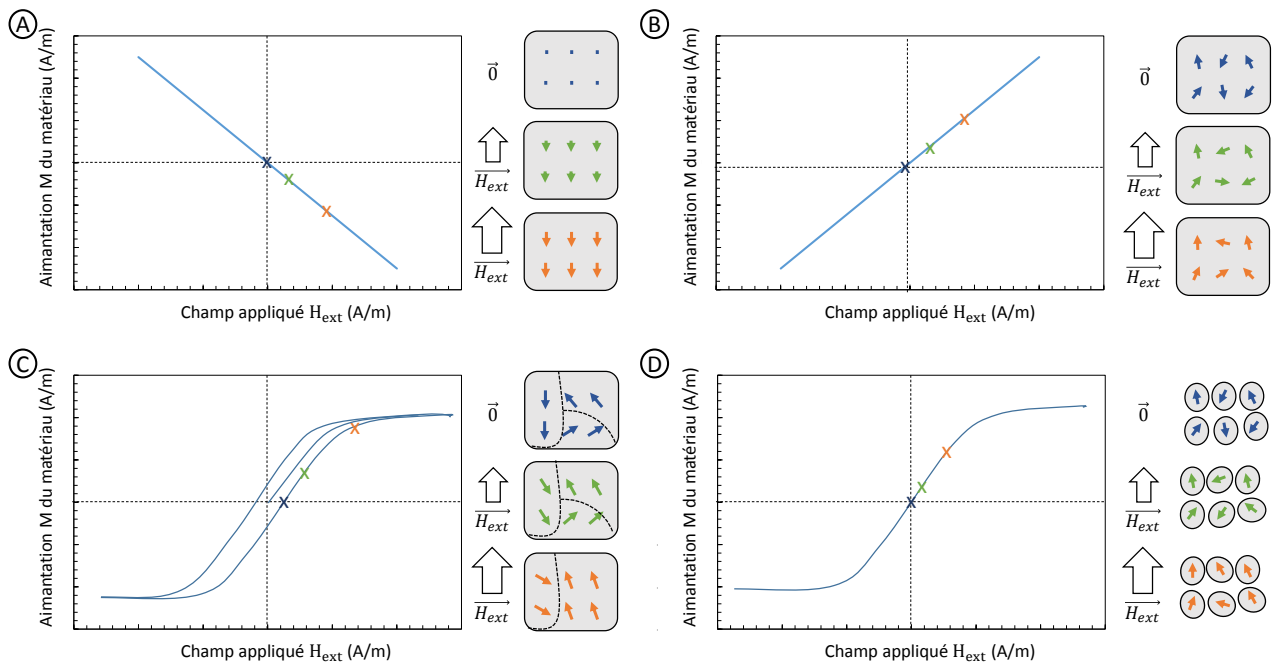


FIGURE 1.1 – Courbes d’aimantations caractéristiques de différents matériaux avec illustrations. A) Matériaux diamagnétiques. Les aimantations sont proportionnelles et opposées au champ appliqué, elles restent faibles. B) Matériaux paramagnétiques. Les aimantations de ces matériaux restent faibles également. C) Matériaux ferromagnétiques. L’aimantation obtenue peut être importante et un moment rémanent persiste après suppression du champ extérieur. D) Matériaux superparamagnétiques. L’aimantation individuelle de chaque particule tend à s’aligner avec le champ extérieur. A champ nul, leur direction est aléatoire et donc l’aimantation est nulle en moyenne.

matériau retrouve son aimantation nulle. Une courbe d’aimantation typique de matériaux paramagnétiques est représentée Fig. 1.1 B.

1.1.3 Ferromagnétisme

Certains matériaux comme le fer, le cobalt ou le nickel sont ferromagnétiques à température ambiante. L’état stable correspond à des moments tous alignés le long du champ appliqué. La susceptibilité d’un matériau ferromagnétique n’est pas un scalaire (le ratio de \vec{M} par \vec{H} en normes a des valeurs de l’ordre de 10^1 à 10^6) et sa courbe d’aimantation n’est pas linéaire (Fig. 1.1 C). Un matériau ferromagnétique qui n’a jamais subi de champ magnétique présente une aimantation totale nulle car si localement, les moments sont alignés les uns avec les autres, à plus grande échelle, il existe des domaines avec des orientations différentes séparés par des parois. Avec l’augmentation du champ magnétique appliqué, les grains ayant l’orientation magnétique alignée avec le champ vont grossir en repoussant les parois de leurs domaines. A champ suffisamment fort, l’ensemble du matériau ne forme qu’un domaine, le matériau est saturé. Avec la diminution du champ appliqué, les parois de domaines sont recréées et l’aimantation moyenne du matériau diminue. Cependant, même après retour à champ nul, le matériau garde une aimantation rémanente dans la direction du dernier champ appliqué. Si un champ opposé est appliqué, les parois de domaine s’étendent en agrandissant les zones d’aimantation parallèle à ce nouveau champ. L’aimantation s’annule au champ coercitif puis se renverse progressivement avec l’augmentation de ce champ jusqu’à atteindre une nouvelle saturation. Si le champ est coupé, le matériau garde une aimantation rémanente alignée avec le dernier champ appliqué et donc ici, opposée à celle de départ. Ce cycle forme une boucle d’hystérésis : la susceptibilité d’un matériau ferromagnétique dépend de sa géométrie

et de son histoire (c'est-à-dire des derniers champs magnétiques auxquels il a été soumis). En effet, la taille et l'aimantation des grains résulte d'une minimisation de l'énergie magnétique totale de la structure qui a trois principales contributions : l'énergie d'échange, l'énergie magnétostatique et l'énergie d'anisotropie. L'énergie d'échange tend à aligner tous les moments dans la même direction. Cependant, au-delà d'un certain volume aligné, l'aimantation globale crée un champ dipolaire fort augmentant l'énergie magnétostatique d'une valeur supérieure au gain d'énergie d'échange réalisé. Pour diminuer l'énergie globale, des domaines magnétiques opposés sont créés et séparés par des parois des domaines. Le type de parois créé et leur géométrie précise dépend de nombreux paramètres modifiant l'énergie d'anisotropie comme la forme globale de la structure, le type de réseau cristallin ou les impuretés et défauts de maille.

Au-delà d'une certaine température nommée température de Curie T_C , les ferromagnétiques ont un comportement paramagnétique, l'énergie thermique est supérieure à l'énergie d'échange et les interactions fortes à la base de cet effet sont perdues.

1.1.4 Antiferromagnétisme

Les matériaux antiferromagnétiques ont aussi une forte interaction d'échange entre leurs moments mais elle les pousse à s'opposer : leur moment résultant est donc nul sans agitation thermique. Avec l'augmentation de la température, leur susceptibilité augmente mais reste faible. La stabilité en champ de ces matériaux est remarquable puisqu'il faut leur appliquer des champs d'une centaine de teslas pour les saturer.

Au-delà de leur température de Néel T_N , ces matériaux sont paramagnétiques.

1.1.5 Superparamagnétisme

En dessous d'un certain volume critique, le minimum d'énergie magnétique d'un matériau ferromagnétique correspond à une configuration avec un seul domaine magnétique. Dans une telle structure, l'énergie d'échange est minimisée et l'énergie magnétostatique n'est pas suffisamment forte pour que la création d'une paroi de domaine diminue l'énergie totale. L'énergie d'anisotropie dont l'expression est donnée équation (1.3) fixe alors une direction préférentielle d'aimantation appelée axe facile et deux états de basse énergie sont alors possibles séparés par une barrière énergétique ΔE proportionnelle au volume V de la particule et définie par l'équation (1.4). Pour changer d'orientation, le moment magnétique passe cette barrière énergétique grâce à l'énergie thermique suivant un temps caractéristique donné par la loi d'Arrhénius équation (1.5).

$$E_{anisotropie} = K \sin^2 \theta \quad (1.3)$$

$$\Delta E = KV \quad (1.4)$$

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (1.5)$$

Si la barrière énergétique, définie par l'équation (1.4), est inférieure à l'énergie thermique $k_B T$, les moments des particules fluctuent entre les différents états et donc le moment moyen à champ nul d'une population de ces particules est nul. L'application d'un champ ambiant les aligne, générant une large aimantation. De telles particules sont dites superparamagnétiques et leur courbe d'aimantation typique est donnée Fig. 1.1 D.

1.2 Capteurs à magnéto-résistance géante

L'effet GMR a été découvert en 1988 par Albert Fert et parallèlement par Peter Grünberg [91, 92]. C'est une découverte qui a eu un grand retentissement par son utilisation rapide dès 1997 dans les disques durs d'ordinateurs, permettant leur miniaturisation, une réduction de leur consommation d'énergie ainsi qu'un stockage et une lecture plus simples des données. Albert Fert et Peter Grünberg ont reçu le prix Nobel en 2007 pour leur découverte.

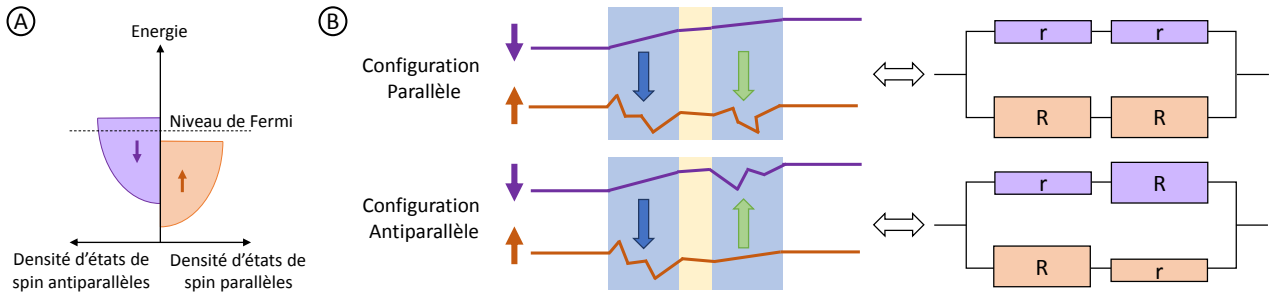


FIGURE 1.2 – Principe de fonctionnement d'un capteur à magnétorésistance géante. A) Dans un matériau ferromagnétique, les densités d'état des bandes de spins parallèles et antiparallèles sont décalées en énergie. Ainsi, au niveau de Fermi, les électrons majoritaires (antiparallèles sur ce schéma) subiront plus de chocs et donc le courant associé subit une résistance supérieure. B) Schéma représentant un empilement de trois couches métalliques, deux ferromagnétiques prenant en sandwich un métal non magnétique dans ses deux configurations extrêmes : parallèle et antiparallèle. Les schémas électriques équivalents sont donnés.

1.2.1 Principe de l'effet GMR

L'effet GMR repose sur la différence de conduction qui existe dans un ferromagnétique entre les électrons de spin parallèle et antiparallèle à l'aimantation intrinsèque du matériau. En effet, l'énergie d'échange dans ces matériaux déséquilibre l'énergie des bandes de conduction parallèle et antiparallèle entraînant une disponibilité plus grande d'un état par rapport à l'autre au niveau de Fermi (voir Fig. 1.2 A).

Une couche ferromagnétique ayant une grande disponibilité d'états parallèle au niveau de sa bande de Fermi aura une faible résistance r pour un électron de spin parallèle mais une grande résistance R pour un électron de spin antiparallèle. Considérons la structure formée par une couche métallique non magnétique prise en sandwich par deux couches métalliques magnétiques. A champ nul, les deux couches ferromagnétiques subissent un couplage antiferromagnétique, elles ont une aimantation antiparallèle l'une à l'autre. L'application d'un champ suffisant aligne les aimantations des deux couches ferromagnétiques, les orientant en configuration parallèle. La traversée successive de ces trois couches a une résistance très différente suivant que les aimantations des couches ferromagnétiques sont parallèles ou antiparallèles. Dans le cas antiparallèle, chacun des électrons (qu'il soit de spin parallèle ou antiparallèle) traverse une couche de faible résistance r et une couche de résistance élevée R alors que dans le cas parallèle les électrons de spin parallèle (par exemple) traversent deux couches de résistance faibles r et les électrons de spin antiparallèle traversent deux couches de résistance élevée R . Un schéma de principe ainsi que le schéma électrique équivalent sont représentés Fig. 1.2 B et montrent que la résistance du dispositif est très différente dans le cas parallèle où elle est de seulement $R_P = \frac{2rR}{r+R} \approx 2r$ si $R \gg r$ et dans le cas antiparallèle où elle atteint $R_{AP} = \frac{1}{2}(r+R) \approx \frac{R}{2}$.

1.2.2 Vanne de spin

Les vannes de spin, capables de détecter des variations de champ faibles, sont le type de capteur GMR que nous avons utilisé. Dans cette structure tricouche, une des deux couches ferromagnétiques a son aimantation bloquée, (c'est la couche dure) l'autre est laissée libre et la couche non magnétique est suffisamment épaisse pour les découpler.

Afin de maximiser la sensibilité du capteur aux faibles champs, l'aimantation de la couche dure est bloquée perpendiculairement à l'orientation naturelle de la couche libre. Ainsi, sa résistance, proportionnelle au cosinus de l'angle entre les aimantations des deux couches magnétiques, varie linéairement avec le champ que celui-ci soit croissant ou décroissant comme illustré sur la Fig. 1.3.

Finalement, le capteur idéal a des résistances R_P et R_{AP} très différentes, il est linéaire et centré autour du champ nul. L'empilement et la géométrie choisis pour les capteurs utilisés dans cette thèse sont décrits dans le

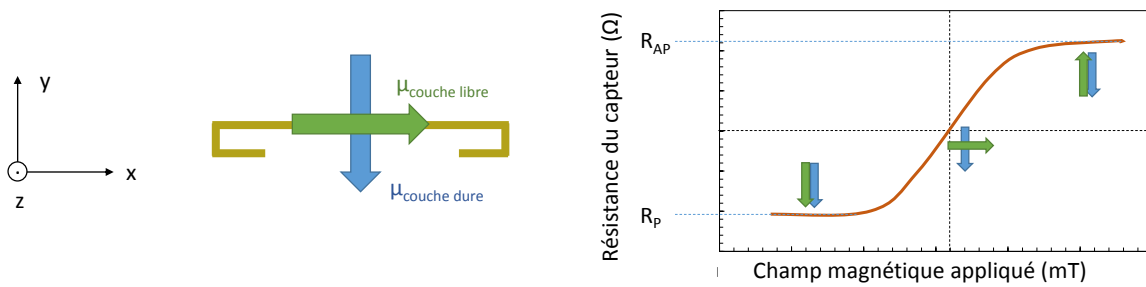


FIGURE 1.3 – Aimantation des couches dures et libres en fonction du champ appliqué.

paragraphe suivant.

1.2.3 Composition et géométrie des capteurs

Pour mieux comprendre la structure des capteurs GMR donnée Fig. 1.4 A, reprenons la courbe d'aimantation d'un matériau ferromagnétique représentée schématiquement sur la Fig. 1.4 B. Cette aimantation dépend de l'histoire magnétique du matériau. En effet, à une valeur de champ donnée, selon le dernier champ fort appliqué, deux valeurs d'aimantations sont possibles. La courbe d'aimantation présente un cycle d'hystérésis (voir §1.1.3). Les caractéristiques principales qui ressortent de ce cycle propre à chaque matériau sont son champ coercitif H_C (champ à appliquer pour un retour à l'aimantation nulle après saturation) et son aimantation rémanente M_R (aimantation du matériau si champ coupé après saturation). Un champ coercitif fort se traduit par une aimantation stable dans le temps et résistante aux faibles champs tandis qu'une aimantation rémanente forte est la caractéristique des aimants permanents. Selon l'application visée différentes propriétés et donc différents matériaux sont choisis. La couche dure doit avoir une coercivité très forte pour ne pas réagir aux variations de champ ambiant. Pour obtenir cette propriété, une couche ferromagnétique à forte polarisation (typiquement CoFe) est couplée à une couche antiferromagnétique (typiquement IrMn ou PtMn) qui la piège par une interaction d'échange anisotrope [93]. La couche ferromagnétique peut être remplacée par une couche antiferromagnétique synthétique (appelée SAF pour "Synthetic Anti-Ferromagnetic layer"). Dans cette configuration, deux ferromagnétiques (type CoFe) sont séparés par une fine couche de Ru. L'énergie d'échange aligne alors les deux couches de façon antiferromagnétique renforçant le blocage de leurs aimantations. De plus, leurs champs magnétostatiques se compensent presque, évitant un couplage indésirable avec la couche libre.

La couche de métal non magnétique (typiquement Cu) sert d'espaceur, c'est-à-dire qu'elle doit permettre un bon découplage entre les deux couches ferromagnétiques pour que le retournement de la couche libre n'affecte pas la couche dure. Cette couche ne doit cependant pas être trop épaisse car, pour avoir un effet GMR, les électrons doivent traverser toute la structure sans perdre leur polarisation. Ainsi, l'épaisseur de l'espaceur doit être inférieure à la longueur moyenne sur laquelle un électron garde la direction de son spin, appelée longueur de diffusion de spin. Finalement, le compromis choisi se situe entre 2 et 2.2 nm de cuivre pour les capteurs présentés dans cette thèse.

Enfin, l'aimantation de la couche libre doit être très sensible aux champs magnétiques extérieurs et donc avoir une faible coercivité (NiFe répond bien à ces attentes). Pour augmenter l'effet GMR, une forte polarisation en spin est aussi souhaitable (CoFe est un bon candidat). Finalement, une structure classique consiste à coupler directement ces deux couches, elles suivent alors l'aimantation du matériau de plus faible coercivité.

Un empilement classique est présenté Fig. 1.4 A¹.

Les propriétés magnétiques dépendent également très fortement de la forme des structures par le biais de

1. Au cours de ma thèse, les dépôts de couches GMR et l'optimisation de leurs paramètres ont été réalisés par Claude Fermon, Myriam Pannetier-Lecoer et Aurélie Solignac.

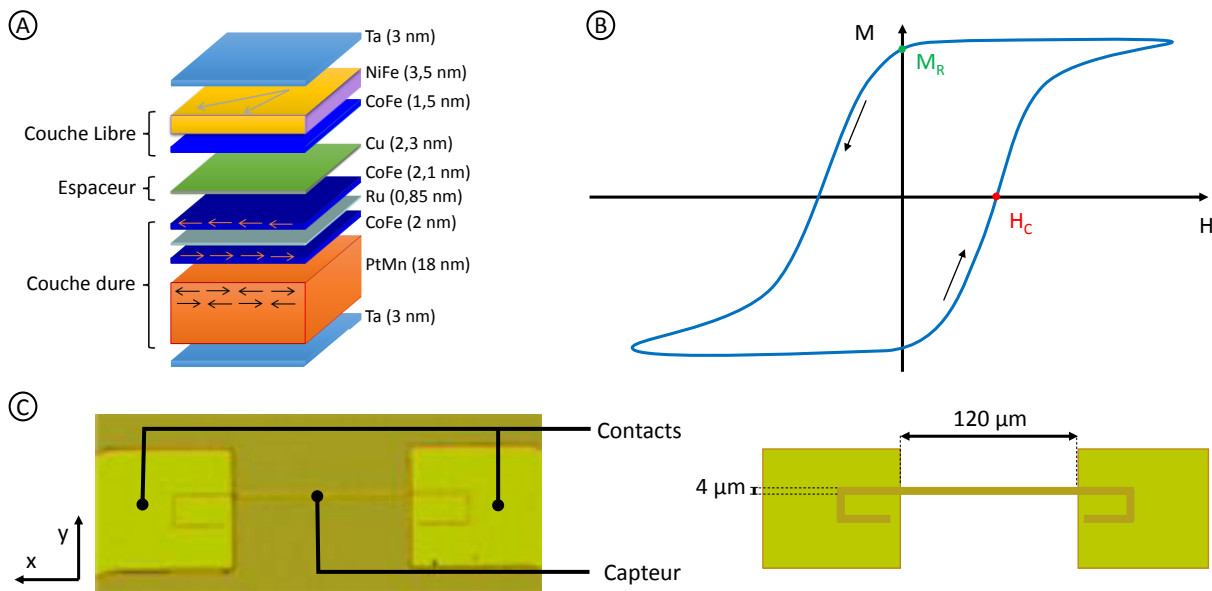


FIGURE 1.4 – A) Schéma d'un empilement classique de GMR. Les épaisseurs de chaque couche sont indiquées ainsi que les éléments constituant la couche dure, la couche libre et l'espaceur. B) Courbe d'aimantation d'un matériau ferromagnétique indiquant son champ coercitif H_C et son aimantation rémanente M_R . C) Photographie et schéma d'un capteur en fin de fabrication. Il a une forme de yoke à forte asymétrie ($4 \times 120 \mu\text{m}^2$.)

l'énergie d'anisotropie. Ainsi, pour améliorer la réponse des capteurs (en particulier avoir une réponse très linéaire et sans hystérésis), un bon moyen est d'introduire une anisotropie dans le système qui va maintenir les moments de la couche libre dans un même domaine magnétique. En effet, une forte dissymétrie entre la longueur et la largeur d'un dispositif va tendre à aligner tous les moments de la couche libre selon sa longueur pour diminuer l'énergie magnétostatique en éloignant au maximum les deux pôles créés. Il a été montré que la forme de yoke (joug, présentée sur la Fig. 1.4 C) permet d'obtenir une aimantation monodomaine [94]. Alors que la couche dure est bloquée avec une aimantation orthogonale à l'axe principal du yoke, la couche libre s'oriente naturellement le long de cet axe. Ainsi, à champ nul le capteur est dans une configuration intermédiaire entre les états parallèle et antiparallèle, il est donc sensible aux variations de champ positives comme négatives.

Finalement, un capteur GMR traduit un signal magnétique (variation de champ) en un signal électrique (variation de résistance). Les caractéristiques de ces capteurs dépendent du choix des matériaux, de la géométrie du dispositif mais aussi de paramètres non maîtrisés comme les impuretés et les défauts de maille. Chaque capteur doit donc être entièrement caractérisé à l'issue de sa fabrication.

1.2.4 Performances

Un capteur GMR est caractérisé par sa sensibilité et son niveau de bruit. Ces deux grandeurs permettent de déterminer la détectivité du capteur, c'est-à-dire le champ magnétique détecté avec un rapport signal sur bruit (SNR, « Signal to Noise Ratio ») de 1.

Sensibilité

Dans le §1.2.1, les cas des deux couches en configuration parallèle et antiparallèle ont été décrits. Entre ces deux états, la variation du champ extérieur entraîne une rotation dans le plan de l'aimantation de la couche libre, faisant donc varier la résistance du dispositif.

La première étape de caractérisation est donc de mesurer la réponse du capteur dans un champ magnétique variable. Le capteur est introduit au centre d'une bobine de Helmholtz calibrée (deux bobines de 5 cm de diamètre séparées de 5 cm alignées sur le même axe). Il est alimenté par un courant continu de 1 mA et son

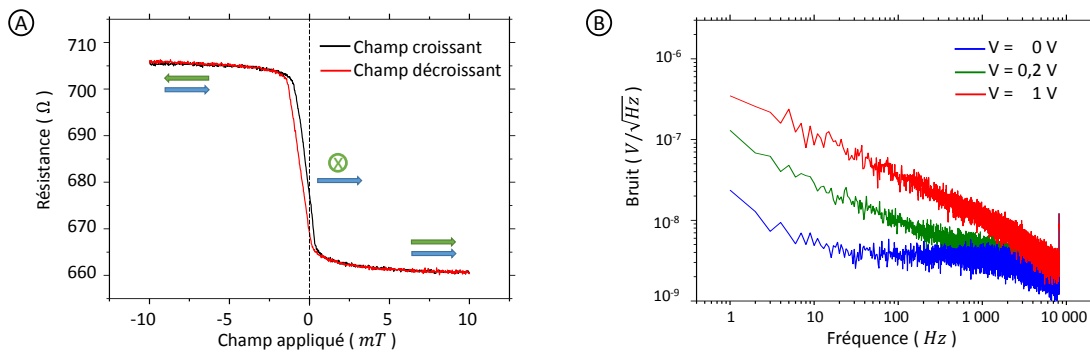


FIGURE 1.5 – A) Exemple de courbe de sensibilité expérimentale, les orientations relatives de la couche dure et de la couche libres sont représentées schématiquement. Ce capteur a une sensibilité de $2.6 \text{ \%} \cdot \text{mT}^{-1}$ autour de 0, de l’hystérésis et un décalage en champ vers les champs négatifs. Ces deux défauts peuvent être compensés par l’ajout d’un champ de bias. B) Exemple de courbe de bruit expérimentale. A courant nul, le bruit est indépendant de la fréquence. Plus on augmente le courant dans le capteur plus le bruit est fort. Le bruit est plus important aux basses fréquences. La chute du niveau de bruit aux alentours de 5 kHz est due au filtre passe bas.

signal est filtré et amplifié par un préamplificateur commercial (Stanford) passe-bas à fréquence de coupure 30 Hz et gain 2. Un programme informatique contrôle un générateur de courant commercial (Kepco) alimentant la bobine qui balaye un champ de -10 mT à 10 mT puis de 10 mT à -10 mT. Il mesure la tension aux bornes du capteur par pas de 0.2 mT. Cette courbe, dont un exemple est donné Fig. 1.5 A, permet de calculer le pourcentage de magnétorésistance du capteur $\%MR$ et à sa sensibilité S définis respectivement par les équations (1.6) et (1.7).

$$\%MR = \frac{2(R_{AP} - R_P)}{R_{AP} + R_P} \quad (1.6)$$

$$S = \frac{(R_1 - R_2)}{(R_1 + R_2)/2} \frac{100}{H_1 - H_2} \quad (1.7)$$

Elle permet également de vérifier la linéarité du capteur et de détecter la présence d’un cycle d’hystérésis ou d’un décalage en champ. La formule (1.7) n’étant valable que dans la zone de linéarité du capteur, un défaut de linéarité sur une large portion de la zone de sensibilité du capteur mène à erreur de conversion entre les variations de résistance enregistrées et les variations de champ magnétiques les induisant. Le décalage en champ fait potentiellement chuter la sensibilité du capteur si la zone de linéarité n’inclut pas toute la gamme des champs à détecter. Enfin, la présence d’un cycle d’hystérésis rend impossible la conversion entre les variations de résistance enregistrées et les variations de champ appliquées puisqu’un même champ peut engendrer deux valeurs distinctes de résistance. Les capteurs utilisés dans cette thèse présentent une légère hystérésis.

Pour s’affranchir de l’hystérésis et du décalage en champ, un champ bias est appliqué, voir Fig. 1.6. Ce champ bias peut provenir d’un aimant permanent ou d’une couche directement intégrée à la structure de la GMR. Dans le cas des biopuces, ce champ de bias est appliqué par l’aimant permanent utilisé lors des expériences pour aimanter les particules superparamagnétiques orthogonalement au plan du capteur (Le principe de l’expérience est détaillé au §1.3). En effet, le champ émis par l’aimant n’étant pas parfaitement vertical, et il existe deux faibles composantes du champ dans le plan du capteur qui peuvent agir comme un champ bias. La composante transverse, dans la direction de la couche dure (axe de sensibilité y), décale la courbe en redéfinissant le direction d’aimantation à champ nul de la couche libre. La composante longitudinale, dans la direction de la couche libre (axe x), agit sur l’hystérésis et la sensibilité en imposant un sens préférentiel de l’aimantation. Evidemment, l’ajout d’un tel champ diminue la sensibilité du capteur et un compromis doit être trouvé grâce à un positionnement précis du capteur par rapport à l’aimant.

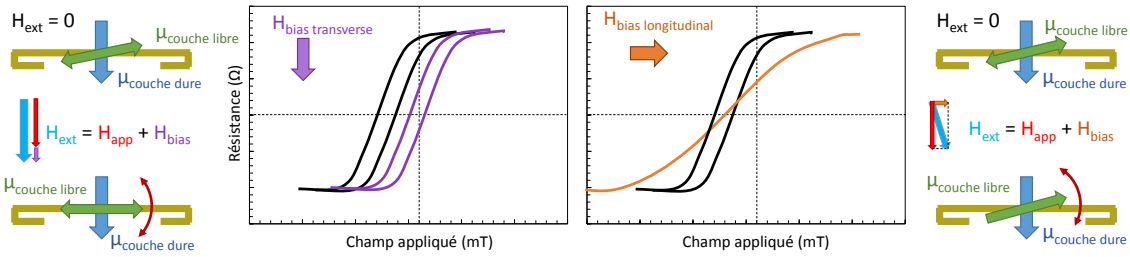


FIGURE 1.6 – Schéma de l'application d'un champ bias et de son effet sur la sensibilité du capteur selon sa direction. Un faible champ bias bien positionné peut réduire l'hystérésis et recentrer la sensibilité, cependant, un champ trop fort ou mal orienté réduit très fortement la sensibilité du dispositif. L'orientation précise de ce champ est donc cruciale.

Bruit

Le capteur doit aussi être caractérisé par une mesure de sa densité spectrale de bruit exprimée en V^2/Hz et présentée sur la Fig. 1.5 B. Un capteur GMR est soumis à trois principaux types de bruits :

- le bruit blanc ou bruit thermique S_{th} d'équation (1.8)
- le bruit basse fréquence ou en $1/f$ $S_{1/f}$ d'équation (1.9)
- le bruit télégraphique ou RTN (pour « Random Telegraphic Noise ») S_{RTN}

$$S_{th} = 4k_BTR \quad (1.8)$$

$$S_{1/f} = \frac{\gamma R^2 I^2}{N_c f^\beta} \quad (1.9)$$

Le bruit thermique est un bruit indépendant de la fréquence provenant directement du mouvement brownien des porteurs de charge dans le capteur de résistance moyenne R . L'origine du bruit basse fréquence est mal connue et son expression, donnée équation (1.9), est empirique. Cette équation repose sur deux paramètres : le paramètre de Hooge γ et le paramètre β dont la valeur est comprise entre 0.5 et 1.5. Ce bruit diminue avec le volume de matériaux puisqu'il est proportionnel au nombre de porteurs de charges N_c . Le RTN est dû à des fluctuations d'aimantation de la couche libre. Si la couche libre est monodomaine aucun RTN n'est observé, mais lorsque plusieurs domaines existent, certains de ces domaines peuvent sauter d'un état à un autre avec une probabilité (et donc une fréquence) dépendant de la taille du domaine, du courant imposé et de la température. Ce bruit se manifeste par la présence de pics Lorentziens dans la densité spectrale et par la présence de sauts d'un niveau à un autre dans une mesure temporelle.

A ces bruits intrinsèques au capteur, s'ajoutent les bruits de la chaîne de mesure et d'acquisition et ceux de l'environnement captés par le capteur. Des densités spectrales typiques de ces bruits et des enregistrements temporels sont présentés Fig. 1.7 A et B.

Le bruit est mesuré dans une chambre blindée afin d'éviter au maximum les parasites environnementaux lors de la caractérisation des capteurs. Le capteur est alimenté avec une tension continue provenant d'une batterie. Il est ensuite inséré dans un pont de Wheatstone qui permet d'obtenir, à l'équilibre, une tension de 0 V à la sortie. Ainsi, seuls sont amplifiés par l'INA 103 (gain 500) les signaux qui sortent de cette situation d'équilibre. Le signal est ensuite filtré et amplifié à nouveau par un préamplificateur (Stanford) avec un passe bas d'une fréquence de coupure de 5 kHz et une amplification supplémentaire de 20. L'acquisition du signal se fait à 16 kHz et un programme calcule la transformée de Fourier du signal reçu. Un exemple du spectre obtenu est donné Fig. 1.5 B. Il permet de vérifier que le bruit blanc correspond à la valeur attendue théoriquement, mais aussi que le capteur n'est pas soumis à trop de RTN ni à des signaux parasites.

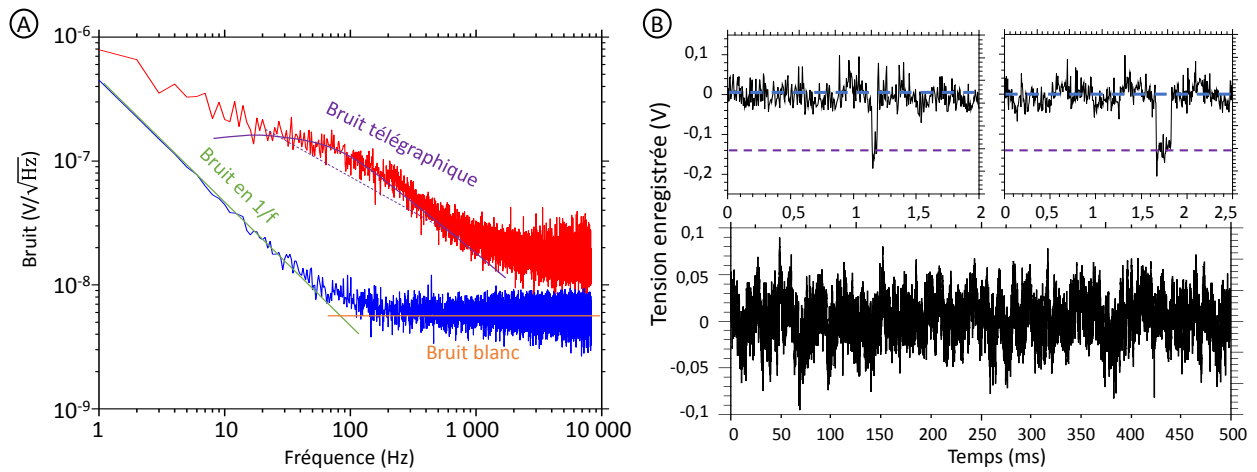


FIGURE 1.7 – A) Exemple de densité spectrale de bruit expérimentale faite avec un passe bas de 10 kHz. La courbe bleue est tracée avec une tension aux bornes du capteur de 0.2 V. La courbe rouge est tracée avec une tension aux bornes du capteur de 1 V. Les courbes de bruit sont toujours soumises aux deux contributions du bruit blanc (constant quelle que soit la fréquence), et du bruit en $1/f$ qui diminue avec la fréquence. Dans certaines conditions, s'ajoute à ces deux bruits, du bruit télégraphique qui déforme la courbe de densité spectrale. B) Enregistrement des fluctuations de tension enregistrées alors que le capteur n'est soumis à aucun signal (gain de 10 000). Les deux courbes du haut montrent du bruit télégraphique. La courbe du bas montre une superposition de bruit blanc et de bruit en $1/f$.

Défectivité

Les deux mesures précédentes permettent de calculer la défektivité du capteur. Elle est définie comme le champ créant une réponse égale au niveau de bruit du capteur sur une bande de fréquences donnée ($SNR = 1$).

Pour notre utilisation en courant continu du capteur, le seuil de détection pertinent est défini comme le champ magnétique donnant un signal trois fois supérieur à la moyenne quadratique du bruit sur toute la plage de fréquences enregistrées lors des expériences (15 Hz - 15 kHz). Elle peut donc varier d'une expérience à l'autre en fonction du boîtier électronique choisi (filtres, qualité des composants, etc.) et des perturbations extérieures (vibrations, branchement d'un appareil, etc.). Les caractéristiques classiques des capteurs utilisés dans cette thèse sont résumées dans le Tableau 1.1. Les capteurs utilisés ont une longueur utile de 120 μm et une largeur de 4 μm .

Type de capteur	Sensibilité	Bruit blanc	Niveau de bruit	Défectivité	Seuil de détection
Yoke de 4 μm	1 - 5%. mT^{-1}	3 - 5 $\text{nV}/\sqrt{\text{Hz}}$	30 - 140 μV	150 - 730 nT	450 - 2200 nT

Tableau 1.1 – Caractéristiques typiques des capteurs utilisés. Le niveau de bruit est donné sur la bande de fréquences utilisée (15 Hz - 15 kHz), il prend en compte l'ensemble des bruits du dispositif et de la chaîne de mesures.

1.3 Description d'un laboratoire sur puce à base de capteurs GMR

Dans cette thèse, les capteurs GMR sont utilisés pour détecter un par un des objets marqués magnétiquement passant dans le canal au-dessus d'eux. La Fig.1.8 illustre le principe de ce comptage dynamique. Le passage de chaque objet magnétique donne lieu à un signal antisymétrique reconnaissable sur lequel le Chapitre 3 revient plus en détails. Le capteur étant alimenté par un courant continu, les variations de résistance générées sont enregistrées sous la forme de variations de tension en fonction du temps. La largeur d'un signal dépend de la

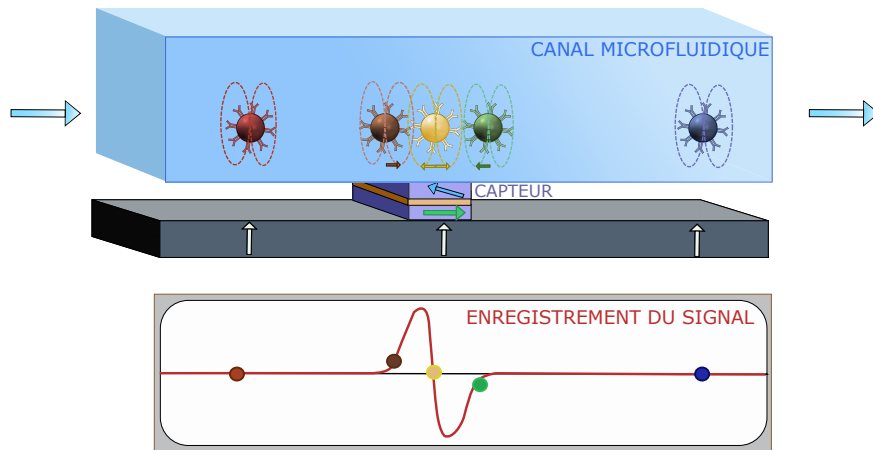


FIGURE 1.8 – Principe de détection illustré sur le cas d’une particule magnétique seule. La bille est représentée à différents instants de son passage par le biais d’un code couleur correspondant à celui des points du signal donné en dessous. La particule, superparamagnétique, est aimantée par un champ permanent de direction perpendiculaire au plan des couches du capteur, afin de ne pas perturber leur aimantation. L’intensité du champ permanent que nous utilisons est de 0.09 T, (il faut appliquer un champ vertical de 0.5 T pour que la sensibilité diminue de moitié sous l’effet de la sortie du plan de l’aimantation des couches). Le champ dipolaire induit par l’aimantation de la particule est ensuite détecté par le capteur GMR. Pour une meilleure compréhension du schéma, seules les composantes tangentielles du moment dipolaire détectées par le capteur sont indiquées par des flèches. La variation de champ perçue en premier par la couche libre l’oriente vers la configuration des aimantations parallèle des couches du capteur, la résistance du dispositif diminue donc et la tension augmente. Quand la bille est au-dessus du centre du capteur, il perçoit les deux composantes opposées du champ dipolaire et la résistance est nulle. Au fur et à mesure qu’elle s’éloigne du capteur, la couche libre ne perçoit que la seconde composante du champ dipolaire, l’orientant cette fois dans la configuration antiparallèle. On a ainsi des signaux symétriques. Le sens des signaux dépend du sens de la couche dure dans le dispositif. La forme bipolaire caractéristique des signaux est un bon facteur discriminant pour les distinguer du bruit.

hauteur et de la vitesse de passage de l’objet, son amplitude dépend de la hauteur de passage et de l’aimantation de l’objet.

Ce laboratoire sur puce est utilisé pour la détection spécifique d’une population cellulaire, objet non magnétique. Les cellules d’intérêt doivent donc être marquées par des billes magnétiques pour pouvoir être comptées avec cette méthode. Ce marquage est spécifique car la surface des billes a été greffée d’anticorps ciblant les cellules d’intérêt. L’objectif est alors de compter chaque cellule marquée sans compter les billes libres restées en solution. Ceci sera expliqué en détails au Chapitre 3.

1.4 Conclusion

Ce chapitre nous a permis d’introduire les grandeurs magnétiques importantes à la compréhension du test GMR. Les notions de sensibilité, niveau de bruit, détectivité et seuil de détection ont été définies. Enfin, le principe de détection des marqueurs magnétiques et leurs propriétés superparamagnétiques ont été décrits. Le chapitre qui suit est consacré au choix des billes utilisées.

Chapitre 2

Caractérisation des marqueurs magnétiques

Le choix des billes magnétiques est une étape très importante dans ce projet car elles sont à l'origine des signaux détectés par les capteurs GMR. Elles doivent de surcroît répondre à un certain nombre d'exigences aussi bien au niveau biologique que magnétique. Au cours de cette thèse, 7 types de billes commerciales provenant de 4 fournisseurs distincts (les billes Chemicell de Chemicell GmbH, les billes Micromod de Micromod Partikeltechnologie GmbH, les Adembeads de la compagnie Ademtech et les Dynabeads de ThermoFisher) ont été testées et caractérisées. Il s'agit de billes superparamagnétiques, comme présentées au §1.1.5, dont nous allons décrire dans la suite de ce chapitre les propriétés et les avantages pour la détection d'objets par des capteurs GMR.

2.1 Propriétés magnétiques des billes

2.1.1 Propriétés générales

Les différentes billes superparamagnétiques commerciales que nous avons utilisées sont constituées de cœurs d'oxydes de fer (maghémite ou magnétite) de taille nanométrique enrobés dans une enveloppe de polymère. La taille des billes varie entre 50 nm et 2.8 μm et leur moment magnétique dépend du nombre de cœurs magnétiques qu'elles contiennent. Comme elles sont superparamagnétiques (voir §1.1.5), elles acquièrent rapidement une aimantation sous l'effet d'un champ magnétique. Ainsi, lors de leur passage dans le canal microfluidique situé au-dessus des capteurs, soumises au champ homogène intégré au dispositif, elles atteignent immédiatement un moment proche de la saturation permettant une détection optimale des signaux générés.

Les billes constituées par un grand nombre de cœurs ont un fort moment magnétique et sont donc facilement attirées par un aimant permanent. Cette propriété permet, certes, d'obtenir des lavages rapides et efficaces mais implique que pendant le test, les billes sont attirées par l'aimant permanent, risquant leur accumulation dans le bas du canal. Cependant, la vitesse de passage a été choisie (de manière empirique) afin de compenser l'attraction du champ permanent sur les billes. L'écoulement est donc peu perturbé par ce champ appliqué.

D'autre part, cette aimantation disparaît immédiatement avec la suppression du champ.

Les différentes billes ont été caractérisées à l'aide d'un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM, pour « Vibrating Sample Magnetometer »).

2.1.2 Description du VSM

Le principe de cet appareil est le suivant (Fig. 2.1 A) [95–97]. L'échantillon à caractériser est monté sur une canne dotée d'un moteur capable de vibrer à une fréquence bien définie (40 Hz). Il est placé dans une enceinte, dont la pression et la température sont contrôlées très précisément, au centre de deux bobines de détection. Un aimant supraconducteur refroidi à l'hélium liquide permet d'appliquer un champ constant au niveau de l'échantillon. Les vibrations verticales de l'échantillon induisent des variations du flux du champ dipolaire créé par l'aimantation à travers les bobines de détection. Les variations de courant générées dans ces bobines

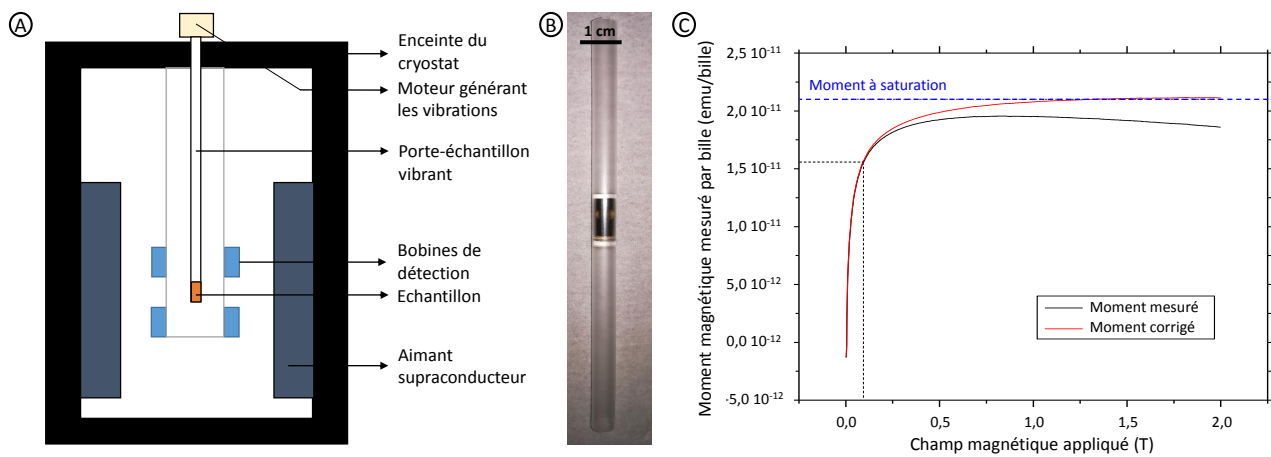


FIGURE 2.1 – A) Schéma de principe du VSM. B) Photographie d'un échantillon liquide encapsulé dans une cuve fermée en plexiglas et fixé sur une paille en plastique. Les contributions diamagnétiques de la paille et du liquide de suspension ont été soustraites. L'aimantation d'une bille a été calculée à l'aide de la concentration volumique donnée par le fournisseur. C) Courbe d'aimantation à 300 K des Dynabeads® MyOne Streptavidin T1. La courbe a été normée pour représenter l'aimantation d'une seule bille.

permettent de déduire le moment magnétique de l'échantillon vibrant. L'appareil, très précis, peut ainsi détecter des aimantations de l'ordre de 10^{-5} emu soit 10^{-8} Am² dans le système international.

2.1.3 Principe d'une mesure d'aimantation en fonction du champ

La courbe à 300 K de l'évolution de l'aimantation de l'échantillon en fonction du champ appliqué permet de déduire les deux caractéristiques magnétiques recherchées des billes :

- leur moment moyen à saturation (l'ensemble des moments des particules sont dans la direction du champ appliqué),
- leur moment à champ d'utilisation.

Pour chaque solution, 50 μ L de suspension de billes commerciales ont été placés dans un récipient en plexiglas jetable conçu spécialement pour cette utilisation. L'ensemble est alors fixé au centre d'une paille en plastique qui se visse sur la canne vibrante du VSM (Fig. 2.1 B). Les mesures d'aimantation en fonction du champ ont été faites à température ambiante (300K) entre 0 et 2 T. La Fig.2.1 C représente la variation en champ de l'aimantation des billes Dynabeads® MyOne Streptavidin T1 présentes dans les 50 μ L de l'échantillon. La contribution diamagnétique linéaire de la paille et du liquide de suspension, visible sur la courbe à fort champ, a été soustraite. La courbe d'aimantation d'une bille seule a été tracée en divisant par la concentration volumique donnée par le fournisseur.

2.1.4 Résultats obtenus

Les propriétés magnétiques mesurées pour chacune des billes magnétiques commerciales testées sont résumées dans le Tableau 2.1. Le moment magnétique moyen des billes au champ utilisé pendant les expériences (90 mT) permet de calculer les variations de champ perçues par le capteur pendant ces mêmes expériences. La détection des objets par le capteur (au point C) repose effectivement sur la variation du champ magnétique ambiant induite par le passage d'un objet aimanté (point B de moment $\vec{\mu}$) créant un champ dipolaire \vec{H}_{dip} dont la formule est donnée par l'équation (2.1).

$$\vec{H}_{dip} = 3\vec{BC} \times \frac{\vec{BC} \cdot \vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^5} - \frac{\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^3} \quad (2.1)$$

L'équation (2.1) montre que l'amplitude et la largeur des signaux obtenus dépendent du moment magné-

Nom court de l'échantillon	Nom complet des billes	Diamètre des billes	Concentration de passage	Moment magnétique à saturation	Moment moyen à 90 mT
Micro50	Micromod	50 nm	$5.5 \cdot 10^{12}/\text{mL}$	$8.7 \cdot 10^{-16}$ emu/bille	$7.2 \cdot 10^{-16}$ emu/bille
Chemi50	Chemicell	50 nm	$1.3 \cdot 10^{15}/\text{mL}$	$> 2.1 \cdot 10^{-16}$ emu/bille	$1.3 \cdot 10^{-16}$ emu/bille
Adem200	Adembeads	200 nm	$4.0 \cdot 10^{11}/\text{mL}$	$1.1 \cdot 10^{-13}$ emu/bille	$6.5 \cdot 10^{-14}$ emu/bille
Micro500	Micromod	500 nm	$5.1 \cdot 10^{10}/\text{mL}$	$> 9.2 \cdot 10^{-12}$ emu/bille	$5.9 \cdot 10^{-12}$ emu/bille
Dyna1	Dynabeads	1 μm	$8.5 \cdot 10^9/\text{mL}$	$2.1 \cdot 10^{-11}$ emu/bille	$1.6 \cdot 10^{-11}$ emu/bille
Micro1.5	Micromod	1.5 μm	$2.3 \cdot 10^9/\text{mL}$	$3.1 \cdot 10^{-11}$ emu/bille	$2.3 \cdot 10^{-11}$ emu/bille
Dyna2.8	Dynabeads	2.8 μm	$8.2 \cdot 10^7/\text{mL}$	$2.4 \cdot 10^{-9}$ emu/bille	$2.3 \cdot 10^{-9}$ emu/bille

Tableau 2.1 – Propriétés magnétiques des particules magnétiques caractérisées.

tique des objets détectés et de leur hauteur de passage par rapport au capteur. Le principal objectif de cette thèse est de distinguer les objets biologiques marqués, des billes seules ou éventuellement agrégées alors que leur hauteur de passage n'est pas maîtrisée. Il est donc essentiel que les moments magnétiques correspondant à ces deux types d'objets soient très différents. Etant noté que le moment magnétique des objets est proportionnel au nombre de billes qu'ils portent, le choix des billes repose donc sur deux critères :

- la maximisation du rapport entre le nombre de billes par cellule et le nombre de billes par agrégat
- un moment magnétique moyen par cellule détectable

Dans la suite de ce chapitre, sont présentées les expériences préliminaires qui ont permis le choix des billes en tenant compte des deux critères définis ci-dessus. Les billes doivent avoir des surfaces fonctionnalisables par des anticorps leur permettant de marquer spécifiquement les cellules. En revanche, leurs interactions non spécifiques avec les échantillons biologiques doivent être minimisées.

Il est surtout absolument nécessaire qu'elles s'agrègent le moins possible. En effet, les objets étant comptés par le dispositif développé grâce aux signaux magnétiques qu'ils émettent, les agrégats doivent être constitués du plus faible nombre de billes possibles afin que l'écart entre les signaux magnétiques non spécifiques et ceux des signaux des cellules marquées soit le plus grand possible, réduisant ainsi le nombre de faux positifs. Parallèlement, il est nécessaire que les cellules soient marquées par un grand nombre de billes, possédant au total un moment magnétique bien plus fort que celui des agrégats.

2.2 Fonctionnalisation des billes

Les billes ont été fonctionnalisées avec deux anticorps différents : un anticorps dirigé contre CD138, antigène porté en plusieurs exemplaires à la surface des cellules de nos cellules modèles, et un autre anticorps, servant de contrôle négatif, de même isotype que le premier mais reconnaissant un antigène non présent à la surface de ces cellules. L'anticorps monoclonal de rat d'isotype IgG2a dirigé contre CD138 de souris a été acheté chez BD PharmingenTM (Produit n° 553712). Une vérification de la présence des antigènes CD138 à la surface des cellules NS1 utilisées a été réalisée en cytométrie en flux et est décrite dans la suite de cette section (§2.2.3). Le deuxième anticorps utilisé est IpaD315, produit au LERI [98] : c'est un anticorps d'isotype IgG2a de souris qui reconnaît un antigène bactérien présent chez Salmonelle et Shigelle et non exprimé par les cellules NS1.

Parmi les billes utilisées dans notre étude, trois types de fonctionnalisations de surface existent. Les groupes ester sulfonique et acide carboxylique réagissent chimiquement avec les anticorps et créent des liaisons covalentes tandis que les billes-streptavidine sont fonctionnalisées via l'interaction biotine-streptavidine par des anticorps préalablement couplés de façon covalente à de la biotine. Le protocole de couplage des anticorps par la biotine

sera donné précisément dans le §4.1.3. Les informations relatives au couplage sont synthétisées dans le Tableau 2.2. Les protocoles commerciaux (Annexe A-H) ont été suivis pour réaliser ces fonctionnalisations. Pour les billes de 50 nm, les protocoles ont été adaptés depuis les Technotes de Micromod (Annexe A), en utilisant les colonnes MACs (Miltenyi, Produit n° 130-042-401). Pour les billes fonctionnalisées par de la streptavidine, le protocole commercial des Dyna1, Annexe F, a été adapté aux différentes billes.

Nom court de l'échantillon	Fonctionnalité des billes	Type d'aimant nécessaire	Protocole commercial	Quantité d'anticorps	Quantité de billes
Micro50	Streptavidine	Colonne à gradient	Annexes A, B et F	0.1 µg	10 µg
Chemi50	Acide carboxylique	Colonne à gradient	Annexes A et C	50 µg	10 mg
Adem200	Acide carboxylique	Aimant permanent	Annexe D	25 µg	1 mg
Micro500	Streptavidine	Aimant permanent	Annexes E et F	1.4 µg	70 µg
Dyna1	Streptavidine	Aimant permanent	Annexe F	20 µg	1 mg
Micro1.5	Streptavidine	Aimant permanent	Annexes G et F	1.2 µg	70 µg
Dyna2.8	Ester sulfonique	Aimant permanent	Annexe H	100 µg	5 mg

Tableau 2.2 – Groupements de surface des billes commerciales et protocoles de fonctionnalisation.

Plusieurs tests ont ensuite été effectués afin de vérifier la bonne fonctionnalisation des billes. Pour les billes micrométriques (entre 0.5 et 2.8 µm) la vérification de la liaison spécifique des billes sur les cellules justifiant de la présence des anticorps à leur surface peut se faire par simple observation au microscope optique. En revanche, pour les billes nanométriques (inférieures ou égales à 200 nm), d'autres solutions, décrites dans les trois paragraphes suivants, ont dû être envisagées.

2.2.1 Vérification de la fonctionnalisation par la diffusion dynamique de la lumière

Les billes de 50 nm ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour « Dynamic Light Scattering »). Cette technique permet de mesurer la distribution en taille d'objets en suspension dans une solution [99, 100]. La DLS (Malvern) donne le rayon hydrodynamique des objets en suspension, c'est-à-dire le rayon d'une sphère dure de coefficient de diffusion équivalent à celui de l'objet mesuré, et est très sensible à l'adsorption de polymères ou de protéines à leurs surfaces, et à la force ionique de la solution utilisée. Cette technique n'est applicable qu'aux objets ayant des tailles comprises entre 1 et 500 nm selon la longueur d'onde du LASER utilisé. Le principe de la mesure repose sur l'hypothèse que les particules sont en mouvement Brownien dans la suspension [101], ainsi, quelques critères doivent être validés. La température est maintenue stable (mesure constante de la température par l'appareil), le liquide est immobile (pas de convection), la suspension est stable (les billes ne sédimentent pas avant la fin de la mesure), les propriétés optiques et la viscosité de la solution sont connues avec une précision meilleure que 0.5%. Une seconde hypothèse nécessaire à l'interprétation de l'intensité de la lumière reçue est que chaque rayon a été diffusé par une et une seule particule. Dans ces conditions, le coefficient de diffusion D des particules peut être relié à leur rayon hydrodynamique R_H par l'équation (2.2), où k_B est la constante de Boltzmann, T la température et η_s la viscosité de la solution. La DLS parvient à une mesure de la distribution des tailles par une mesure du temps caractéristique au bout duquel l'intensité diffusée par les particules à un angle donné (θ) a totalement changé. Plus précisément, une courbe d'autocorrélation est tracée en comparant l'intensité enregistrée à t à celle perçue à $t=0$. La donnée extraite est le temps caractéristique à partir duquel l'autocorrélation s'effondre. Les positions relatives des particules en suspension ont alors complètement changé. Comme nous le montre l'équation (2.3), l'ajustement de cette courbe d'autocorrélation permet de déterminer τ et D et donc de calculer le rayon hydrodynamique des

particules. Dans cette équation, q est le vecteur d'onde dont l'expression est donnée par l'équation (2.4).

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D} \quad (2.2)$$

$$G(\tau) = B + A \sum e^{-2qD\tau} \quad (2.3)$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.4)$$

Cette technique de caractérisation doit être utilisée avec précaution. La solution doit être propre, filtrée et pour valider une mesure, plusieurs échantillons sont nécessaires. En effet, les particules dont on souhaite mesurer la taille doivent être dans une certaine gamme de concentrations. Une solution trop ou trop peu diluée donnera des résultats aberrants. Si très peu de particules sont dans le faisceau du laser, leur nombre ne sera pas constant au cours d'une mesure et l'autocorrélation chutera très rapidement sans rapport avec la taille des objets. Si de très nombreuses particules sont présentes, alors les rayons diffusés par une particule auront de grandes chances d'être à nouveau déviés par une seconde voire une troisième particule, et l'interprétation de l'intensité reçue par l'appareil sera faussée.

L'analyse a été faite en mode distributif avec un régulateur automatique et, comme les propriétés optiques des billes sont inconnues, les tailles données sont celles issues de l'interprétation la plus directe, celles dites « d'intensité ». Les Chemi50 ont été diluées dans une solution de PBS stérile préalablement filtrée à 5 μm , car cette méthode est sensible aux impuretés de large taille. (L'abréviation PBS, utilisée tout au long de cette thèse correspond au tampon phosphate GIBCO commercialisé par Life Technologies® nommé DPBS pour « Dulbecco's Phosphate Buffered Saline » et qui ne contient ni CaCl_2 ni MgCl_2). Les billes ont été passées nues à 100 $\mu\text{g/mL}$ et 20 $\mu\text{g/mL}$, puis après fonctionnalisation par l'anticorps anti-CD138 ou l'anticorps IpaD315 à 23 $\mu\text{g/mL}$ et 15 $\mu\text{g/mL}$. Une première distribution autour de 4 nm de diamètre d'origine inconnue et une seconde autour de 50 nm correspondant aux billes ont systématiquement été obtenues. Les résultats pour ce deuxième pic sont résumés dans le Tableau 2.3. Les anticorps faisant environ 10 nm, cette méthode devrait montrer une augmentation du rayon hydrodynamique de la bille de 5 à 10 nm selon les configurations. Avec cette première caractérisation, il est difficile de conclure à la réussite du greffage d'anticorps car les écart-types des mesures sont trop importants. En revanche, l'absence de pic de diamètre supérieur à 50 nm prouve l'absence d'agrégation significative de ces billes, mais nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un faible nombre d'agrégats, trop dilués pour être perçus par cette technique.

Nom de l'échantillon	Concentration	Diamètre moyen \pm erreur
Chemi50 nues	100 $\mu\text{g/mL}$	49.05 nm \pm 2.95
	20 $\mu\text{g/mL}$	51.53 nm \pm 1.96
Chemi50-antiCD138	23 $\mu\text{g/mL}$	52.58 nm \pm 3.91
	15 $\mu\text{g/mL}$	55.40 nm \pm 2.28
Chemi50-IpaD315	23 $\mu\text{g/mL}$	56.10 nm \pm 0.42
	15 $\mu\text{g/mL}$	57.50 nm \pm 0.71

Tableau 2.3 – Résultat des caractérisations par DLS de billes Chemi50.

2.2.2 Vérification de la fonctionnalisation par un test bandelette

Lors d'un stage de master 2¹ un autre type de test (dit « bandelette » ou « lateral flow immunoassay » présenté dans l'Introduction) a permis de mettre en évidence la fonctionnalisation des billes de 50 et 200 nm par les anticorps. Pour cela, sur des membranes de nitrocellulose sont immobilisés en ligne des anticorps dirigés contre

1. Stage effectué par Laurence Fermon

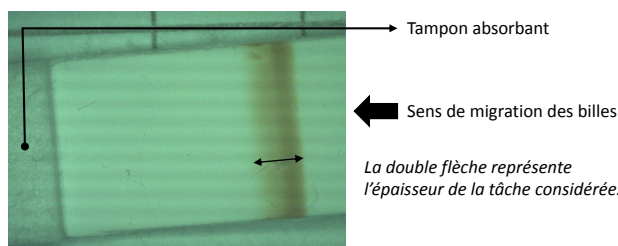


FIGURE 2.2 – Photographie de l'un des tests bandelette effectués (Adem200). La ligne « contrôle » est colorée pour toutes les billes fonctionnalisées testées.

des anticorps de souris, et reconnaissant donc spécifiquement les anticorps immobilisés sur les billes magnétiques. Ces membranes, coupées sous forme de petites bandelettes de 5 mm de largeur et quelques centimètres de longueur permettent en quelques minutes, après trempage dans une solution contenant les anticorps de souris couplés aux billes, de montrer visuellement la présence de ces anticorps sur les billes. La visualisation est apportée par l'accumulation des billes magnétiques au niveau de la bande contrôle, billes qui ont été stoppées par l'interaction entre les anticorps immobilisés sur la nitrocellulose, et les anticorps couplés aux billes.

Le test est réalisé en plongeant la bandelette dans une solution de billes magnétiques censées être fonctionnalisées par les anticorps, diluées en PBS dans un puits de 300 μL . La solution migre le long de la bande de nitrocellulose par capillarité (grâce à la présence de tampons absorbants). L'apparition d'une bande marron au niveau de la bande dite « contrôle » signifie que les billes sont retenues par l'anticorps immobilisé, et que les anticorps (ici Ipa-D315) sont bien greffés sur les billes. Trois suspensions de 100 μL de PBS contenant respectivement les billes Chemi50, Micro50 et Adem200 toutes fonctionnalisées par des anticorps IpaD315 ont ainsi été analysées (voir Fig. 2.2). L'épaisseur des bandes obtenues, corrélée au nombre de billes ayant été capturées par les anticorps immobilisés sur la membrane de nitrocellulose et dirigés contre les anticorps de souris, ainsi qu'à leur taille, ont été mesurées sur le logiciel ImageJ et reportées dans le Tableau 2.4. Ces expériences montrent que les billes de 50 nm et 200 nm sont toutes correctement fonctionnalisées par cet anticorps. Le même travail n'a pas été répété sur les billes fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 car ce sont des anticorps de rat qui ne sont donc pas *a priori* ciblés par cet anticorps anti-souris. Cependant, les deux lots ont été fonctionnalisés en même temps en suivant le même protocole.

Billes	Concentration	Epaisseur de la tache
Chemi50	$2 \cdot 10^{11}$ billes/mL	0.38 mm
Micro50	$1.8 \cdot 10^{11}$ billes/mL	1.5 mm
Adem200	$5.0 \cdot 10^9$ billes/mL	1.8 mm

Tableau 2.4 – Résultats des vérifications par un test bandelette de la fonctionnalisation par IpaD315 des billes nanométriques. La bande contrôle est formée par des anticorps dirigés contre les anticorps de souris. Les billes agissent ici comme marqueurs optiques et l'épaisseur de la bande apparue sur la bande de contrôle est relevée.

2.2.3 Vérification de la fonctionnalisation par la cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée² pour deux vérifications dans cette partie préliminaire. Un premier test a été réalisé afin de valider la présence de l'antigène CD138 à la surface des cellules NS1. Puis, un second test a permis de vérifier que ces cellules NS1 sont correctement immunocapturées par les billes Adem200 fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138. Ce second test permet de s'assurer simultanément de plusieurs

2. Ces tests ont été effectués par Anne Wijkhuisen.

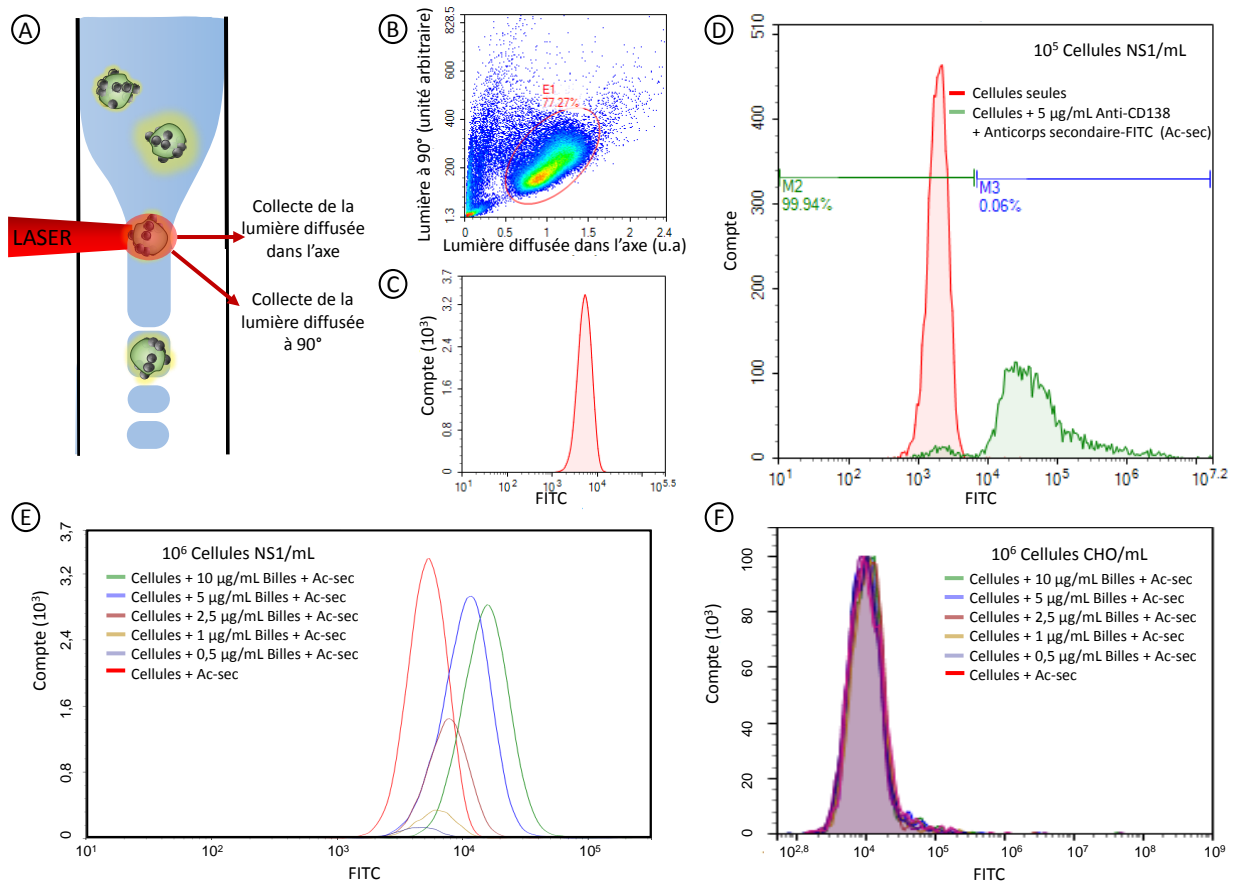


FIGURE 2.3 – A) Schéma du dispositif. B) Exemple des résultats bruts d'une mesure : chaque point représente un objet dont l'abscisse correspond à la lumière diffusée dans l'axe et l'ordonnée à la lumière diffusée à 90°. La population repérée comme faisant partie des cellules NS1 est entourée. Les points à gauche de cette zone sont interprétés comme des débris cellulaires tandis que les points au-dessus sont attribués au groupement de plusieurs cellules dans le faisceau laser, donc non interprétable. C) Données analysées en fluorescence pour une suspension. Le niveau de fluorescence des objets détectés est donné en abscisse tandis que le nombre d'objets comptés ayant cette fluorescence est précisé en ordonnée. D) Bilan des mesures de vérification de la présence des antigènes CD138 à la surface des cellules NS1. E) Le bilan des mesures de vérification de l'immunocapture des cellules par les billes fonctionnalisées met en évidence la relation entre la concentration en billes et la fluorescence des cellules. F) La courbe bilan des CHO ne varie pas en fonction de la concentration en billes. La labélisation observée pour les cellules NS1 est bien spécifique.

faits :

- les billes sont fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138,
- cet anticorps est toujours capable de reconnaître ses cibles à la surface des cellules NS1 (structure toujours fonctionnelle après la greffe à la surface des billes)
- ce marquage est spécifique (les billes ne s'accrochent pas à des cellules ne présentant pas l'antigène CD138, ici les cellules CHO).

La cytométrie en flux repère des tailles, des structures cellulaires/granulosités et des niveaux de fluorescence [102, 103]. Un schéma de principe est présenté sur la Fig. 2.3 A. L'échantillon est concentré en un flux étroit avant de passer devant un laser. L'analyse de la lumière diffusée dans l'axe donne la taille des objets observés tandis que la lumière diffusée à 90° renseigne sur leur granulosité/structure. Grâce à ces deux informations, la population majoritaire d'intérêt est repérée (Fig. 2.3 B). D'autre part, à 90°, l'appareil mesure également la fluorescence émise par l'échantillon, ce qui permet de savoir si cette population d'intérêt a été capturée ou non par des labels spécifiques fluorescents (Fig. 2.3 C). Afin de repérer le marquage des cellules par les anticorps ou les billes fonctionnalisées, le marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluorescéine ou FITC pour « fluorescein isothiocyanate » en anglais) a été greffé sur des anticorps anti-anticorps de rat, appelés anticorps

secondaires. Les anti-CD138 (qu'ils se trouvent à la surface des billes ou libres) étant des anticorps de rat, la fluorescence des objets est ainsi attribuable à la présence du complexe [bille - anti-CD138 - anticorps secondaire - fluorochrome]. Pour que l'interprétation des résultats soit correcte il est essentiel que tous les échantillons aient la même concentration en anticorps secondaires fluorescents.

Le premier test effectué permet de vérifier la présence des antigènes CD138 à la surface des cellules NS1 (Fig. 2.3 D). Lors d'une première étape, les cellules NS1 sont passées sans aucun marqueur en tampon PBS afin de calibrer leur niveau de fluorescence intrinsèque. Cette mesure est nécessaire car les unités de mesure utilisées sont arbitraires et donc non directement comparables d'une expérience à une autre. 10^5 NS1/mL sont ensuite incubées 30 min avec les anticorps anti-CD138 à 5 $\mu\text{g/mL}$ en PBS à 0.5% de BSA (albumine sérique bovine, en anglais « Bovine Serum Albumin »). La solution est lavée une fois dans ce même tampon et incubée 30 min supplémentaires une fois les anticorps secondaires fluorescents ajoutés à une concentration fixée (1/100 de la concentration d'achat). La solution est lavée et reprise en PBS avant son passage dans le cytomètre. Le fort décalage en fluorescence observé entre l'échantillon contenant les cellules seules et l'échantillon contenant les cellules avec l'anticorps anti-CD138 et l'anticorps secondaire fluorescent permet de conclure à la forte expression de l'antigène CD138 par cette lignée cellulaire.

Afin de vérifier la bonne immunocapture des cellules par les billes fonctionnalisées, cinq échantillons ont été préparés en PBS contenant chacun 10^6 cellules NS1, une concentration fixe d'anticorps secondaires fluorescents et une concentration variable en billes fonctionnalisées anti-CD138 (entre 0.5 et 10 $\mu\text{g/mL}$). Les échantillons sont incubés 30 minutes et passés en cytométrie en flux où le niveau de fluorescence de chaque objet repéré comme faisant partie de la population majoritaire (et donc correspondant à une cellule NS1) a été évalué. Les résultats sont présentés Fig. 2.3 E et F. Ils montrent une dose-réponse de reconnaissance pour les cellules NS1 c'est-à-dire que plus la concentration en billes est forte, plus les cellules sont fluorescentes. Ces résultats prouvent que les billes fonctionnalisées se lient aux cellules et sont reconnues par l'anticorps secondaire. D'autre part, la même expérience menée sur les cellules CHO, non porteuses de l'antigène CD138, valide la spécificité de ce ciblage. En effet, l'augmentation de la concentration en billes dans les suspensions de CHO ne modifie absolument pas le niveau de fluorescence des cellules.

2.3 Comportement des billes dans les suspensions biologiques

Comme nous l'avons montré précédemment, toutes les billes choisies ont pu être fonctionnalisées avec les anticorps souhaités. L'étape suivante consiste à estimer pour chaque type de billes, d'une part le temps nécessaire à la labélisation des cellules et, d'autre part, le nombre de billes moyen obtenu à la surface des cellules. Cette étude n'a été effectuée que pour les billes de diamètre supérieur à 500 nm car les billes plus petites ne sont pas observables au microscope optique. Il aurait alors été nécessaire d'utiliser la cytométrie en flux qui présente l'inconvénient de ne pas pouvoir déterminer facilement le nombre de billes par cellule. En effet, la cytométrie reste une technique manipulable uniquement par les experts et ne pourra pas donner de mesure directe du nombre de billes par cellule [104].

Le nombre théorique de billes de rayon R_{bille} qu'il faut pour recouvrir la surface d'une cellule de rayon $R_{cellule}$ est donné par la formule : $N = 4R_{cellule}^2/R_{bille}^2$. Les cellules NS1 ont majoritairement un diamètre compris entre 6 et 12 μm , ce qui a été mesuré avec l'appareil TC10 de Biorad. Par la suite nous le fixerons à la valeur de 9 μm , ce qui signifie qu'elle peut être potentiellement recouverte en moyenne par 38 Dyna2.8, 130 Micro1.5, 300 Dyna1 ou 1200 Micro500. Ce nombre théorique aide simplement à fixer les concentrations de billes introduites dans les premières études.

2.3.1 Cinétique d'immunocapture avec différents types de billes

Afin de déterminer le nombre de billes à introduire pour labéliser correctement les cellules, une première expérience a été réalisée en PBS avec trois échantillons contenant chacun 10^5 NS1/mL mélangées respectivement à 5 10^5 Dyna2.8/mL, 20 10^5 Dyna2.8/mL et 50 10^5 Dyna2.8/mL. Ces trois échantillons sont mis en

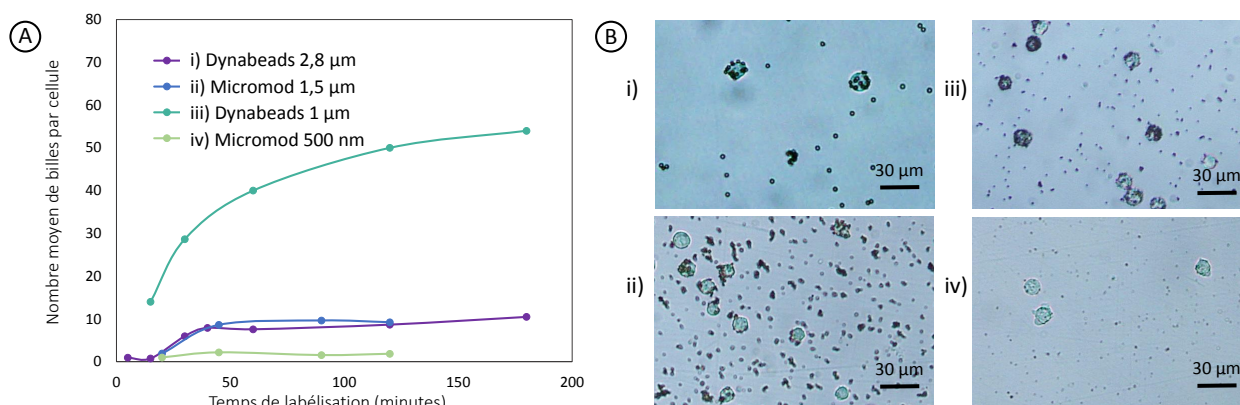


FIGURE 2.4 – A) Résumé des expériences cinétiques. L'évaluation du nombre moyen de billes par cellule est reportée en fonction du temps de labélisation pour chaque type de billes. B) Exemples des photographies de ces suspensions après 2h de labélisation.

rotation à 20°C. Au bout de 40 minutes, 100 μL de chacune des suspensions sont prélevés pour une observation au microscope. Les prélèvements sont introduits dans des puits, laissés à sédimenter 15 minutes et observés au grossissement 20X. Quatre régions distinctes de l'échantillon sont ensuite photographiées pour permettre une analyse plus précise. Les billes visibles sur chaque cellule sont comptées à l'œil. Le nombre moyen de billes évalué par cellule est le même pour la solution intermédiaire et la solution concentrée (7.9 contre 8.0) et bien au-dessus de celui de la concentration faible (4.0). Par la suite, les expériences de cinétique de labélisation pour les Dyna2.8 ont été faites à $20 \cdot 10^5$ billes/mL. En effet, la concentration de billes minimum permettant une labélisation optimale est sélectionnée pour minimiser le nombre et la taille des agrégats.

La cinétique de labélisation a été étudiée en PBS pour les quatre types de billes de diamètre supérieur à 500 nm. Quatre échantillons de 1 mL à 10^5 NS1/mL ont été préparés et mélangés aux billes fonctionnalisées anti-CD138 aux concentrations indiquées dans le Tableau 2.5. 100 μL ont été régulièrement prélevés dans chaque suspension, laissés sédimenter 15 minutes et photographiés au grossissement 20X dans quatre régions distinctes. Les images résultantes ont été analysées en comptant à l'œil le nombre de billes visibles par cellule. Des exemples de clichés de chaque suspension et les courbes obtenues sont présentées Fig. 2.4.

Type de billes	Concentration des billes	Labélisation moyenne à 120 min
Dyna2.8	$2 \cdot 10^6$ billes/mL	8.6 billes/cellule
Micro1.5	$1.3 \cdot 10^7$ billes/mL	9.2 billes/cellule
Dyna1	$3 \cdot 10^7$ billes/mL	50 billes/cellule
Micro500	$1.2 \cdot 10^8$ billes/mL	1.8 billes/cellule

Tableau 2.5 – Résumé des expériences de cinétique d'immunocapture pour les 4 billes de diamètre supérieur à 500 nm.

Les billes Micro1.5 et Micro500 ont été éliminées de la suite de l'étude. En effet, les billes Micro500 ont une labélisation assez faible après deux heures de rotation et les Micro1.5 forment de trop nombreux agrégats (Fig. 2.4 B.ii et iv et Tableau 2.5).

2.3.2 Agrégation des billes

Pour l'étape suivante, menée uniquement sur les Dyna2.8 et les Dyna1, les billes seules, fonctionnalisées avec les anticorps IpaD315 et celles fonctionnalisées avec les anticorps anti-CD138 ont été vortexées deux minutes, diluées en PBS, vortexées à nouveau deux minutes, laissées à sédimenter au fond du puits et photographiées 10 fois chacune. Les clichés ont ensuite été traités avec le logiciel ImageJ qui a permis, après binarisation

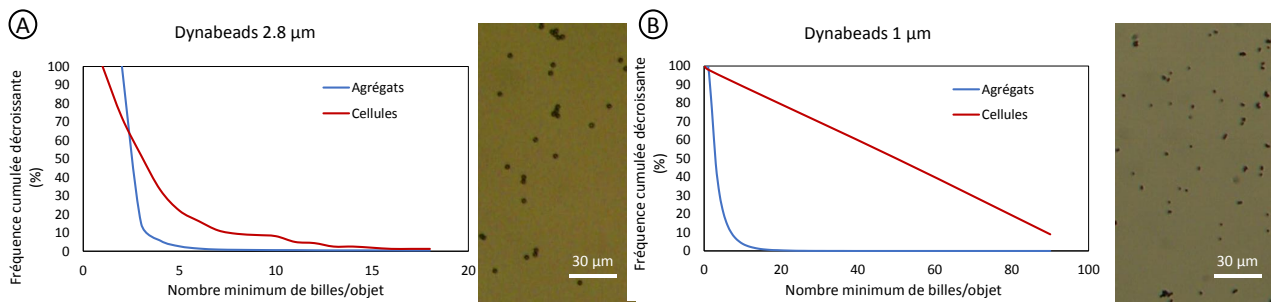


FIGURE 2.5 – Fréquences cumulées décroissantes du nombre de billes par objet pour un échantillon contenant des 10^5 NS1 par millilitre et des billes fonctionnalisées par l’anticorps anti-CD138, et pour un échantillon de billes libres en PBS. A) Résultats obtenus pour les cellules et les agrégats dans les échantillons utilisant les billes Dyna2.8. B) Résultats obtenus pour les cellules et les agrégats dans les échantillons utilisant les billes Dyna1. Les billes recherchées doivent maximiser le nombre de cellules détectables et minimiser le nombre de billes libres détectables. Or, à distance fixe du capteur, la détectabilité d’un objet dépend uniquement de son nombre de billes. Ainsi, si on suppose une configuration dans laquelle le nombre minimum de billes pour qu’un objet soit détectable est N , ce graphe donne directement le pourcentage d’agrégats et de cellules détectable dans chaque cas. La comparaison de ces deux graphiques permet d’affirmer que les Dyna1 permettent une meilleure discrimination entre les agrégats et les cellules que les Dyna2.8.

des images, de compter et de mesurer automatiquement les particules présentes sur la photographie. Une courbe de répartition des billes dans les agrégats a alors été obtenue et a pu être comparée à celle de la répartition de ces mêmes billes sur les cellules. Elles sont présentées Fig. 2.5. Il apparaît très clairement sur ces deux figures que les billes de $1\ \mu\text{m}$ permettent *a priori* une bien meilleure discrimination entre les cellules et les agrégats que les billes de $2.8\ \mu\text{m}$.

2.3.3 Bilan des expériences précédentes et choix des billes

Le choix des billes repose sur deux critères essentiels. D’une part, elles doivent immunocapturer les cellules très efficacement et de manière spécifique et d’autre part, leur signal magnétique individuel doit être suffisamment faible pour ne pas être détectable par le capteur GMR et limiter ainsi le nombre de faux positifs. Grâce à l’étude décrite dans cette section, il est possible de choisir les billes les plus adaptées à notre étude.

Dans le cas des billes nanométriques (entre 50 et $200\ \text{nm}$), les billes libres seules ne sont pas détectables par le capteur, même à $1\ \mu\text{m}$ de distance. De plus, les billes de $50\ \text{nm}$ sont stables en solution et ne forment pas de nombreux agrégats comme nous l’avons vu dans le §2.2.1. Ces deux propriétés sont souhaitables dans le cadre de notre étude. Cependant, ces billes doivent être capables de labéliser très fortement les cellules en moins de 2 heures. D’après la formule (2.1), pour que le champ dipolaire d’une cellule labélisée soit détectable à $20\ \mu\text{m}$ de distance du capteur GMR, il faut qu’elle soit recouverte de :

- 3 000 billes Adem200 ($200\ \text{nm}$ de diamètre)
- plus de 300 000 billes Micro50 ($50\ \text{nm}$ de diamètre)

Or, à cause de difficultés techniques déjà évoquées au §2.3.1, il est délicat de déterminer le nombre de billes nanométriques en surface des cellules et aucun moyen technique ne permet d’être sûr qu’une cellule possède le nombre d’antigènes suffisants en surface pour fixer un si grand nombre de billes nanométriques. Ainsi, en l’absence de contrôle visuel rapide pour cette option, l’optimisation de la concentration en billes et du temps de labélisation est une tâche délicate et nous avons préféré sélectionner des billes visibles au microscope optique pour mettre au point notre dispositif sur des échantillons dont la répartition des billes dans les agrégats et sur les cellules peut être vérifiée facilement.

Dans le cas des billes micrométriques (Dyna2.8 ou Dyna1), une bille seule à $1\ \mu\text{m}$ du capteur est détectable. Cependant, en éloignant le capteur du canal une telle bille isolée peut facilement devenir indétectable. Cette idée suggérée par l’équation (2.1) sera reprise et justifiée en détails dans le §3.2. D’autre part, avec ces billes, il est impératif que les agrégats soient peu nombreux et restent petits. En effet, la taille importante de ces billes fait

qu'il est impossible d'en mettre plus de 38 et 300 (respectivement pour les Dyna2.8 et Dyna1) par cellule, ce qui reste un nombre assez faible. Le maintien d'un contraste important (idéalement d'au moins un facteur 10) entre signaux spécifiques et non spécifiques impose alors un niveau d'agrégation très bas. Ces billes micrométriques ont des moments élevés : pour obtenir un champ minimum de $1 \mu\text{T}$ à $20 \mu\text{m}$ du capteur (valeur arbitraire), 4 Dyna2.8 ou 54 Dyna1 suffisent. Au vu des degrés de labélisation obtenus pour ces deux types de billes, les cellules marquées donnent majoritairement des signaux supérieurs à cette valeur lorsqu'elles passent au milieu du canal. Il faut alors s'assurer que peu d'agrégats puissent donner des signaux comparables lorsqu'ils passent au bas du canal.

Les Dynabeads sont donc les billes les plus adaptées dans le cadre de cette étude. Il est cependant indispensable de limiter au maximum la formation des agrégats.

Dissociation des agrégats de billes

D'après l'étude précédente, il est préférable de choisir les Dyna1 qui ont un rapport « nombre de billes par cellule/nombre de billes par agrégat » supérieur à celui des Dyna2.8. Cependant, si les Dyna2.8 ne s'agrégeaient pas ou si leurs agrégats pouvaient être disloqués, elles présenteraient un grand intérêt dans le cadre de notre projet. En effet, les cellules marquées de 4 billes sont détectables jusqu'à $20 \mu\text{m}$ de haut dans le canal (alors que 54 billes Dyna1 sont nécessaires). D'autre part, elles immunocapturent les cellules en seulement 45 minutes (au lieu de 2h pour les Dyna1).

Différents essais utilisant des méthodes physiques et/ou chimiques ont été réalisées pour supprimer les agrégats de billes. Ils ont été effectués à concentration constante de billes ($2 \cdot 10^6$ billes/mL). Après l'application de chaque méthode, des prélèvements de $100 \mu\text{L}$ sédimentés 15 minutes ont été photographiés au microscope optique (grossissement 20X) et 4 de ces photographies par échantillon ont été traitées avec le logiciel ImageJ. Les résultats sont interprétés en comparant la répartition des billes dans les agrégats pour chaque échantillon à un échantillon contrôle n'ayant rien subi.

Les séparations physiques, plus simples à mettre en œuvre ont d'abord été testées, mais aucune n'a donné de résultat satisfaisant comme résumé dans le Tableau 2.6.

Test effectué	Résultat
Sonication 30 s	Aucune amélioration
Sonication 1 min	Aucune amélioration
3 cycles de Sonication 30 s / vortex	Aucune amélioration
3 cycles de Sonication 1 min / vortex	Aucune amélioration
Filtration sur $5 \mu\text{m}$	Perte presque totale des billes

Tableau 2.6 – Tests de dissociation des agrégats physiques effectués et leurs résultats.

Les solutions chimiques ont alors été envisagées. Quatre détergents ont été testés seuls, ou en combinaisons :

- le SDS (sodium dodecyl sulfate),
- le tween 20,
- le triton X-100,
- le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate).

Le Tableau 2.7 résume la composition des solvants utilisés pour cette étude et les résultats obtenus. La répartition des billes en agrégats a été évaluée deux fois, une première fois après resuspension des billes dans le solvant et une seconde après trois cycles de 1 minute de sonication / 1 minute de vortex. Directement après le mélange, aucune variation significative n'est observée entre les solvants, cette mesure est utilisée pour définir l'état initial des suspensions. En moyenne, $67\% \pm 5.7\%$ des objets sont composés d'une seule bille.

Nom de l'échantillon	Solvant	% de SDS	% de Triton	% de Tween20	% de CHAPS	Taux de billes seules après sonication/vortex
A	PBS	0	0	0.1%	0.1%	47 %
B	Eau DI	0	0	0	0	78 %
C	PBS	0.1%	0	0	0.1%	67 %
D	Eau DI	0.1%	0	0.1%	0	84 %
E	PBS	0	0.1%	0.1%	0	67 %
F	Eau DI	0	0.1%	0	0.1%	75 %
G	PBS	0.1%	0.1%	0	0	77 %
H	Eau DI	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	91 %

Tableau 2.7 – Solvants testés pour la dissociation des agrégats de Dyna2.8 et résultats des essais associés. Dans ces suspensions, les billes sont à la concentration de $2.0 \cdot 10^6$ /mL, c'est à dire la concentration de la solution contenant les cellules.

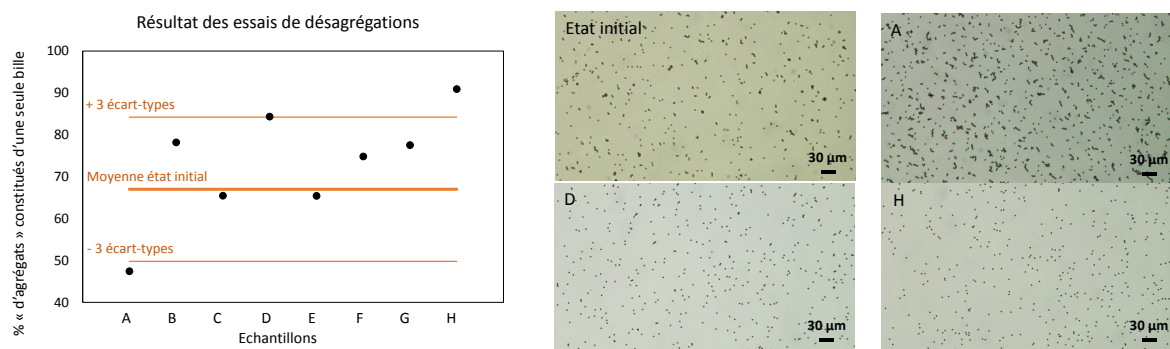


FIGURE 2.6 – Etude de la dissociation des agrégats de billes dans les différentes conditions : la donnée qui nous intéresse principalement est le pourcentage d'objets composés d'exactly 1 bille après ajout des surfactants et sonication/vortex. Des photographies représentatives des échantillons sont données. L'état initial est la suspension avant les trois cycles de sonication/vortex, toutes les suspensions sont dans des états très comparables (5% de variations). Seules trois conditions donnent des résultats significatifs (c'est à dire en dehors de la moyenne ± 3 écart-types des états initiaux) dont un qui agrège les billes et deux qui ont tendance à dissocier les agrégats.

Le pourcentage de billes seules présentes dans chaque suspension après les cycles de sonication/vortex sont représentées Fig. 2.6. Finalement seuls trois milieux semblent avoir un effet significatif pour dissocier les agrégats de billes. La suspension A, semble augmenter l'agrégation des billes de façon assez marquée avec seulement 47% de billes seules, alors que la barre basse de significativité (établie comme la moyenne - 3 écart-types de l'état initial) est à 50%. Cet effet est d'ailleurs assez net sur le cliché de cette suspension présenté Fig. 2.6. D'autre part, les suspensions D et H, semblent avoir un effet bénéfique, puisque respectivement 84% et 91% des objets sont constitués d'une seule bille dans ces suspensions alors que la barre haute de significativité (établie comme la moyenne + 3 écart-types de l'état initial) est à 84%. Ainsi, les détergents les plus efficaces semblent être le SDS et le Tween20.

Pour savoir si cette solution est applicable aux suspensions cellulaires cependant, il reste à vérifier que les cellules survivent au moins 2 heures dans ces milieux d'intérêt, puis que les anticorps greffés restent fonctionnels. Pour la survie cellulaire, les NS1 ont été préparées dans les tampons suivants :

- PBS, pour l'échantillon contrôle
- PBS + SDS (à 0.1%, 0.03% et 0.01%)
- PBS + Tween20 (à 0.1%, 0.03% et 0.01%)
- PBS + SDS + Tween20 (à 0.1%, 0.03% et 0.01% chacun)

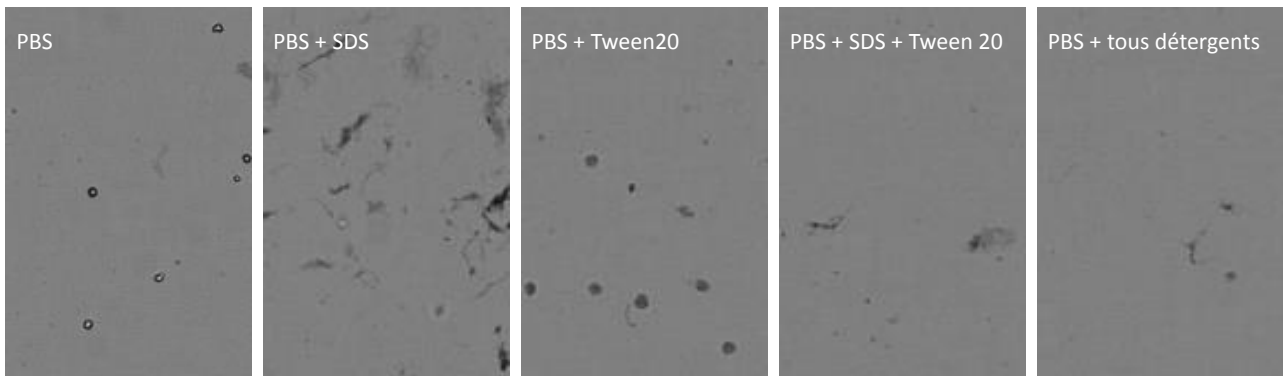


FIGURE 2.7 – Photographies des cellules après deux heures passées dans les solutions indiquées. La première photographie est issue de l'échantillon contrôle avec un taux de survie des cellules de 96%. Les autres échantillons dont les photographies sont présentées ici contiennent des concentrations en détergent intermédiaires : 0.03% et aucune cellule n'a survécu aux deux heures.

— PBS + SDS + Tween20 + CHAPS + Triton (à 0.1%, 0.03% et 0.01% chacun)

Après deux heures, les cellules ont été comptées au TC20 (Automated cell counter, Biorad) avec du bleu de trypan, colorant qui marque uniquement les cellules mortes. La survie pour l'échantillon contrôle en PBS a été évalué à 96%. Toutes les autres suspensions ont été évaluées à 0% de survie. Les photographies données Fig. 2.7 confirment bien que toutes les cellules sont mortes, quelles que soient les conditions (hors contrôle). Le détergent, même en très faibles quantités et bien qu'efficace pour dissocier les agrégats, ne peut donc pas être utilisé dans nos échantillons.

Choix des billes

Finalement, aucun traitement efficace n'a été trouvé pour diminuer le nombre d'agrégats de billes Dyna2.8. Par conséquent, les billes Dyna1 ont été sélectionnées. Comme elles sont bien plus nombreuses à la surface des cellules que dans les agrégats, les signaux respectifs seront plus facilement identifiables. Les différents cycles de sonication/vortex effectués sur ces billes n'ont pas permis de réduire l'agrégation.

2.3.4 Détermination de la concentration appropriée en billes pour l'immunocapture

Dans l'ensemble des expériences préliminaires, les Dyna1 ont été utilisées à une concentration de $3 \cdot 10^7$ billes/mL. Cette concentration a été choisie arbitrairement sur un échantillon de forte concentration cellulaire (10^5 NS1/mL) sur la base d'un simple calcul numérique du nombre théorique N de billes de rayon R_{billes} pouvant être fixées à la surface d'une cellule de rayon $R_{cellule}$ ($N = 4R_{cellule}^2/R_{bille}^2$, voir §2.3). Elle doit cependant être optimisée pour obtenir la meilleure immunocapture possible tout en limitant l'agrégation, sur une gamme de concentrations pertinente. Un premier test a consisté à incuber trois suspensions de cellules à 10^5 NS1/mL avec des concentrations de billes différentes (30 , 15 et $7,5 \cdot 10^6$ billes/mL) pendant 2 heures. 100 μ L de chacune des suspensions ont été photographiés après 15 minutes de sédimentation. Les photographies sont présentées sur la Fig. 2.8 A, B et C. Cette expérience montre qu'entre $7,5 \cdot 10^6$ billes/mL et $1,5 \cdot 10^7$ billes/mL la labélisation des cellules augmente. En revanche, entre $1,5 \cdot 10^7$ billes/mL et $3 \cdot 10^7$ billes/mL la labélisation ne varie pas, alors que les agrégats se font plus nombreux et plus gros. Après cette observation faite à la concentration arbitraire de 10^5 NS1/mL, une deuxième expérience a été faite (aux concentrations de 10^4 NS1/mL et 10^3 NS1/mL) pour vérifier que cette concentration de billes convenait sur une gamme assez large de concentrations en cellules. En effet, dans une véritable expérience, la concentration en cellules est inconnue et donc la même concentration de billes doit être introduite quel que soit l'échantillon. La Fig. 2.8 D et E montre que les immunocaptures semblent tout à fait correctes à ces dilutions également. Ainsi, les expériences suivantes ont été réalisées avec une concentration

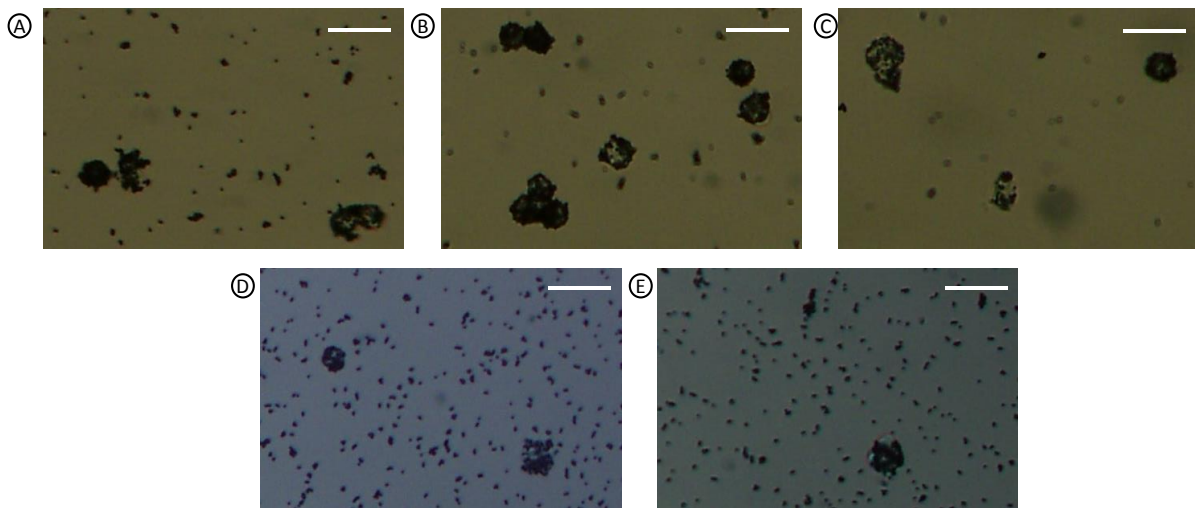


FIGURE 2.8 – Photographies des cellules NS1 après deux heures de labélisation par des Dynal-anti-CD138. A) 10^5 NS1/mL + $3 \cdot 10^7$ billes/mL B) 10^5 NS1/mL + $1.5 \cdot 10^7$ billes/mL C) 10^5 NS1/mL + $7.5 \cdot 10^6$ billes/mL D) 10^4 NS1/mL + $1.5 \cdot 10^7$ billes/mL E) 10^3 NS1/mL + $1.5 \cdot 10^7$ billes/mL

en Dynal de $1.5 \cdot 10^7$ billes/mL, correspondant à $23 \mu\text{g/mL}$ de billes. Par la suite, les concentrations en billes seront données en $\mu\text{g/mL}$ car c'est l'unité la plus répandue dans la littérature.

2.3.5 Labélisation dans différents milieux

La labélisation test a été réalisée en :

- Milieu de culture (Sigma Aldrich)
- Sérum de veau fœtal (FBS Gibco, ThermoFisher)
- Plasma de souris (produit au laboratoire)
- Plasma de lapin (produit au laboratoire, §4.1.4)
- Sérum de lapin (produit au laboratoire, §4.1.4)

Une expérience a aussi été réalisée en PBS pour contrôle.

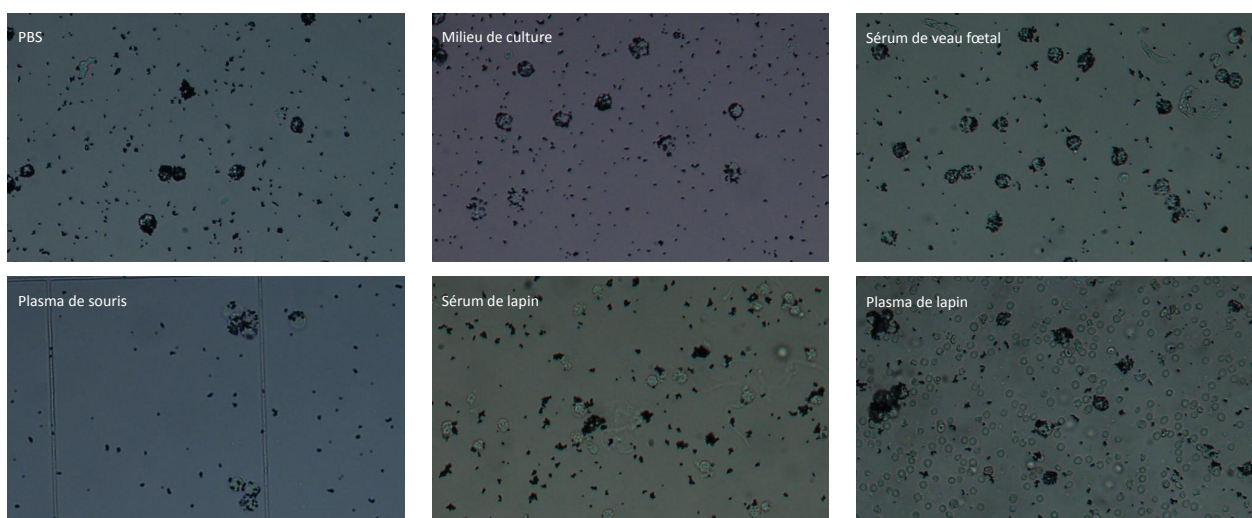


FIGURE 2.9 – Photographies des cellules NS1 après deux heures passées dans 1 mL des tampons indiqués avec $23 \mu\text{g}$ de Dynal-anti-CD138.

Pour achever cette étude sur les billes magnétiques, nous avons testé la labélisation des cellules NS1 par les Dyna1-anti-CD138 dans des produits sanguins de différentes espèces et des milieux physiologiques afin de montrer que le dispositif que nous développons permet l'utilisation de matrices biologiques réelles. En effet, l'agrégation des billes et la labélisation des cellules sont deux phénomènes qui dépendent de très nombreux paramètres comme la température, la force ionique du milieu, l'affinité de leurs surfaces etc. Or, il est important, dans le cas d'un test de diagnostic, de donner des résultats robustes qui dépendent peu des conditions d'exécution.

Pour tous ces milieux, sauf pour le plasma de souris, une suspension de $5 \cdot 10^4$ NS1 et 23 μg de Dyna1-anti-CD138 a été mélangée 2 heures à 20°C dans 1 mL de tampon, puis un prélèvement de 100 μL a été laissé à sédimenter 15 minutes avant d'être photographié 4 fois pour une analyse visuelle. Pour le plasma de souris, seuls 30 μL de solution ont été préparés en respectant les mêmes proportions. Les résultats des labélisations sont présentés Fig.2.9.

Les évaluations quantitatives des labélisations et agrégations, sont très longues et fastidieuses, elles n'ont donc pas été faites. Il s'agissait simplement d'une vérification préliminaire. Des études quantitatives seront effectuées par la suite avant une utilisation effective de ces tampons pour le test GMR. Nous détaillerons ici nos premières conclusions. Dans le milieu de culture, le sérum de veau, le plasma de souris et le plasma de lapin, les billes ont immunocapturé les cellules en deux heures et le nombre et la taille des agrégats sont comparables à la suspension contrôle en PBS. En sérum de lapin en revanche, dans le même temps, peu de marqueurs magnétiques ont fixé leur cible et de nombreux agrégats se sont formés. Ainsi, cette expérience préliminaire met en évidence l'importance du choix d'une matrice adaptée. Pour mettre au point notre test de diagnostic, une évaluation quantitative devra être effectuée avec du plasma, du sérum et du sang humain pour déterminer quelle est la matrice la plus pertinente. Bien qu'absolument nécessaires, ces expériences n'ont malheureusement, pas pu être réalisées pendant cette thèse pour des questions d'autorisation de manipulation de produits sanguins humains.

2.4 Conclusion

Après l'étude des propriétés magnétiques et biologiques de 7 types de billes commerciales les Dynabeads® MyOne Streptavidine T1 (Dyna1) ont été choisies.

Ces billes sont utilisées à une concentration de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et la labélisation des cellules prend 2h à 20°C sous faible agitation. La labélisation des cellules NS1 par les Dyna1 a donné des résultats corrects dans le PBS, le milieu de culture, le sérum de veau fœtal, le plasma de souris et le sérum de lapin.

Chapitre 3

Simulations numériques et modélisation

Le système étudié au cours de cette thèse est une biopuce constituée de capteurs GMR qui détectent les variations de champ induites par le passage de différents objets aimantés s'écoulant de manière laminaire dans un canal microfluidique collé au-dessus de ces capteurs. Ces objets aimantés peuvent être des billes magnétiques seules, des agrégats de billes ou des cellules marquées par ces billes. Le signal d'un objet dépend de leur hauteur de passage, du nombre de billes qu'ils portent et de la géométrie du capteur. La modélisation théorique décrite dans ce chapitre permet d'avoir une meilleure compréhension des influences relatives des différents paramètres. Elle a guidé les choix expérimentaux aussi bien pour la conception du capteur que pour la sélection des billes, comme décrit au Chapitre 2. Toutes les simulations de cette thèse ont été effectuées en Fortran par des calculs analytiques.

3.1 Simulation du passage d'un objet

3.1.1 Billes seules

Le modèle le plus simple est celui des billes individuelles. Elles sont aimantées par un aimant permanent dont le champ est perpendiculaire aux couches qui constituent le capteur. Le schéma du dispositif est donné Fig.3.1 A.

Le capteur GMR réagit aux variations de champ magnétique par un changement de sa résistance (voir Chapitre 1). En première approximation, la résistance d'un capteur à magnétorésistance géante varie linéairement avec la composante du champ magnétique ambiant parallèle à son axe de sensibilité. En effet, ces capteurs étant constitués de couches minces, ils sont insensibles aux variations de champ selon l'axe z, perpendiculaire à ces couches, (tant que l'intensité de ce champ perpendiculaire n'entraîne pas l'aimantation de la couche dure hors du plan des couches). L'axe de sensibilité y du capteur est colinéaire au vecteur vitesse des billes passant au-dessus de celui-ci. La géométrie utilisée pour le capteur le rend insensible aux variations de champ selon l'axe x.

Les billes magnétiques sont aimantées selon l'axe z et émettent un champ magnétique appelé champ dipolaire. Le modèle le plus simple correspond à un moment magnétique $\vec{\mu}$ (une bille isolée) situé en un point B se déplaçant de manière rectiligne et uniforme par rapport à un point C situé sur le capteur. Cette situation très simplifiée est schématisée Fig.3.1 B. L'équation (3.1) donne le champ provenant de B perçu au point C.

$$\vec{H}_{dip} = 3\vec{BC} \times \frac{\vec{BC} \cdot \vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^5} - \frac{\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^3} \quad (3.1)$$

En se déplaçant, le point B, de moment $\vec{\mu}$, crée des variations de champ magnétique au niveau du point C. En réalité, le capteur percevant les variations de champ a une surface non nulle. Ainsi, le champ perçu par le capteur, pour une position donnée de la bille, correspond à l'intégrale, sur la surface du capteur, du champ dipolaire émis par B. Ce calcul a été fait par Guanxiong *et al.* et donne la formule de l'équation (3.2) [86].

Le signal créé par le mouvement de la bille au-dessus du capteur est alors l'ensemble des couples (position de la bille, valeur de l'intégrale calculée) pour chaque position successive de la bille lors de son déplacement rectiligne et uniforme dans le canal. On considère une bille à la position (x_B, y_B, z_B) et de moment $\vec{\mu}$ faisant un angle θ avec \vec{z} et dont la projection sur le plan (xOy) fait un angle ψ avec \vec{x} . L'origine O du repère est prise au centre du capteur en deux dimensions de longueur L et de largeur l selon son axe sensible, donc la coordonnée verticale des points du capteur, z_C est nulle ici.

$$\begin{aligned} H_y = & \frac{\mu}{Ll} \left(\left(\frac{y_l}{q_2} \left(\frac{x_r}{r_2} - \frac{x_l}{r_1} \right) + \frac{y_r}{q_4} \left(\frac{x_l}{r_4} - \frac{x_r}{r_3} \right) \right) \sin \theta \sin \psi \right. \\ & + \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_3} - \frac{1}{r_4} \right) \sin \theta \cos \psi \\ & \left. + \left(\frac{h}{q_2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) + \frac{h}{q_4} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \cos \theta \right) \end{aligned} \quad (3.2)$$

où $x_r, x_l, y_r, y_l, h, r_1, r_2, r_3, r_4, q_2$ et q_4 sont définis comme suit.

$$\begin{aligned} x_r &= \frac{L}{2} - x_B & x_l &= -\frac{L}{2} - x_B \\ y_r &= \frac{l}{2} - y_B & y_l &= -\frac{l}{2} - y_B \\ h &= z_B - z_C \\ r_1 &= \sqrt{x_l^2 + y_l^2 + h^2} & r_2 &= \sqrt{x_r^2 + y_l^2 + h^2} \\ r_3 &= \sqrt{x_r^2 + y_r^2 + h^2} & r_4 &= \sqrt{x_l^2 + y_r^2 + h^2} \\ q_2 &= \sqrt{y_l^2 + h^2} & q_4 &= \sqrt{y_r^2 + h^2} \end{aligned}$$

Pour appliquer ce calcul, il faut cependant vérifier la validité de l'approximation dipolaire dans nos conditions expérimentales. Le doute est permis pour les billes micrométriques. En effet, l'approximation dipolaire n'est valable que si la taille de l'objet créant le champ est faible (facteur 10) devant la distance entre cet objet et le récepteur.

Pour une bille de $1 \mu\text{m}$ à $3 \mu\text{m}$ du capteur, cette approximation n'est *a priori* pas valable. Cependant, les billes considérées sont en fait constituées de plusieurs cœurs de magnétite superparamagnétiques de quelques nanomètres de diamètre englobés dans une matrice de polymère. Ainsi, finalement, une bille magnétique correspond non pas à une bille de $1 \mu\text{m}$ avec un moment donné mais à une multitude de cœurs magnétiques répartis aléatoirement dans une boule de $1 \mu\text{m}$ de diamètre (Fig.3.1 C).

La structure interne des MNPs (nombre et taille moyenne de nanoparticules par bille) a été déduite par un ajustement de la courbe d'aimantation mesurée au VSM. Le moment massique de la magnétite étant connu [105], la taille moyenne d'une nanoparticule suffit à déterminer leur moment à saturation μ_{NP} et la direction θ_0 moyenne des moments par rapport à la verticale à un champ \vec{H} donné. Par exemple, pour une Dyna1, en prenant un diamètre moyen d_0 des nanoparticules de magnétite à 9.6 nm avec un moment à saturation volumique μ_{vol} de 312 emu/cm^3 (correspondant à un moment massique à saturation de 60 emu/g avec une masse volumique de la magnétite à 5.2 g/cm^3 [105]), l'ajustement de la courbe d'aimantation (voir Fig.3.1 D) est satisfaisant en considérant $146\,000$ nanoparticules par bille (ce qui est très inférieur à $1\,130\,280$, nombre maximum calculé par un rapport des volumes). Cet ajustement, d'équation (3.3) où les paramètres μ_{NP} et a (paramètre de Langevin) sont définis par les équations (3.4) et (3.5), tient compte également de la contribution diamagnétique ($\chi_{dia}H$) provenant du porte échantillon utilisé et du liquide de suspension :

$$\mu_{mesure} = N\mu_{NP} [1/\text{th}(a) - 1/a] + \chi_{dia}H \quad (3.3)$$

$$\mu_{NP} = \frac{\pi d_0^3 \mu_{vol}}{6} \quad (3.4)$$

$$a = \frac{\mu_{NP}H}{k_B T} \quad (3.5)$$

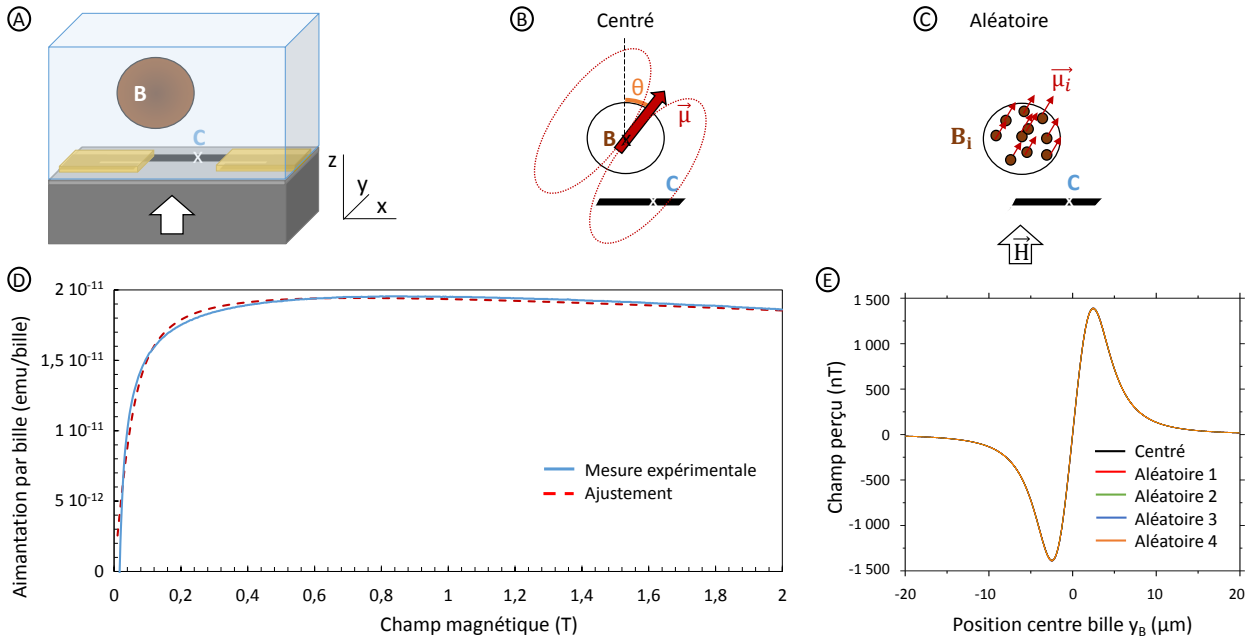


FIGURE 3.1 – A) Schéma du dispositif (ce schéma n'est pas à l'échelle). Une bille magnétique aimantée par un aimant de champ vertical passe quelques micromètres au-dessus du capteur magnétique. B) Modèle ponctuel de la bille magnétique. Une bille est considérée comme un point ayant un moment $\vec{\mu}$ faisant un angle θ avec la verticale et un angle ψ avec l'axe x . C) Modèle des billes multi-cœurs. Chaque MP est constituée de plusieurs nanoparticules identiques définies comme la particule moyenne du modèle de Langevin ajustant la courbe d'aimantation expérimentale des billes. D) Ajustement de la courbe d'aimantation expérimentale des Dynal. Un bon accord est obtenu en considérant $d_0 = 9.6$ nm, $N = 146$ 000, et $\chi_{dia} = -1.1 \cdot 10^{-12}$ emu/T E) Superposition de 5 courbes issues de la simulation du passage d'une bille. Une des simulations considère une bille du modèle ponctuel, les quatre autres sont obtenues pour différents tirages du modèle aléatoire. Aucune différence n'est observée.

L'angle moyen θ_0 du moment de la particule avec le champ est défini par :

$$\theta_0 = \arccos\left(\frac{1}{2} \frac{(\sqrt{1 + 4a^2} - 1)}{a}\right) \quad (3.6)$$

Pour cette première simulation, le passage d'un point B de moment $\vec{\mu}$ correspondant au moment moyen d'une bille calculé grâce à la courbe d'aimantation est comparé au passage d'une boule de diamètre d contenant N particules magnétiques réparties aléatoirement et ayant chacune la taille moyenne d_0 et le moment magnétique moyen $\mu_{NP,0}$ calculés en supposant une loi de Langevin pour l'aimantation des nanoparticules de magnétite. Ces deux objets ont été simulés dans les mêmes conditions (soumis à un champ H de 90 mT, passant à une hauteur z_B de 3 μm par rapport au capteur). Les courbes résultantes sont présentées sur la Fig. 3.1 E. Le modèle donne des résultats satisfaisants pour la simulation du passage d'une bille au-dessus du capteur. Ceci n'est pas surprenant au vu du très grand nombre de nanoparticules par bille. Finalement, les billes sont modélisées dans la suite de la thèse par des points de moment $\vec{\mu}$.

Ce modèle très simple des billes individuelles peut alors être utilisé pour mieux comprendre l'influence des différents paramètres (les dimensions du capteur, la position de la bille, les angles du moment des billes, la fréquence d'acquisition etc.) agissant sur les signaux enregistrés par le capteur. La Fig. 3.2 et le Tableau 3.1 montrent l'influence de chaque paramètre sur le signal induit par le passage d'une bille Dynal au-dessus du capteur. Le champ dipolaire perçu par le capteur est à chaque fois calculé pour 4 valeurs d'un paramètre alors que les autres sont fixés à une valeur par défaut.

Comme présenté sur la Fig 3.2, les différents paramètres testés (les dimensions du capteur, la position de la bille, les angles du moment des billes, la fréquence d'acquisition, le champ permanent appliqué et la température) influent sur l'amplitude, la largeur ou la symétrie des signaux émis par le capteur. La hauteur de

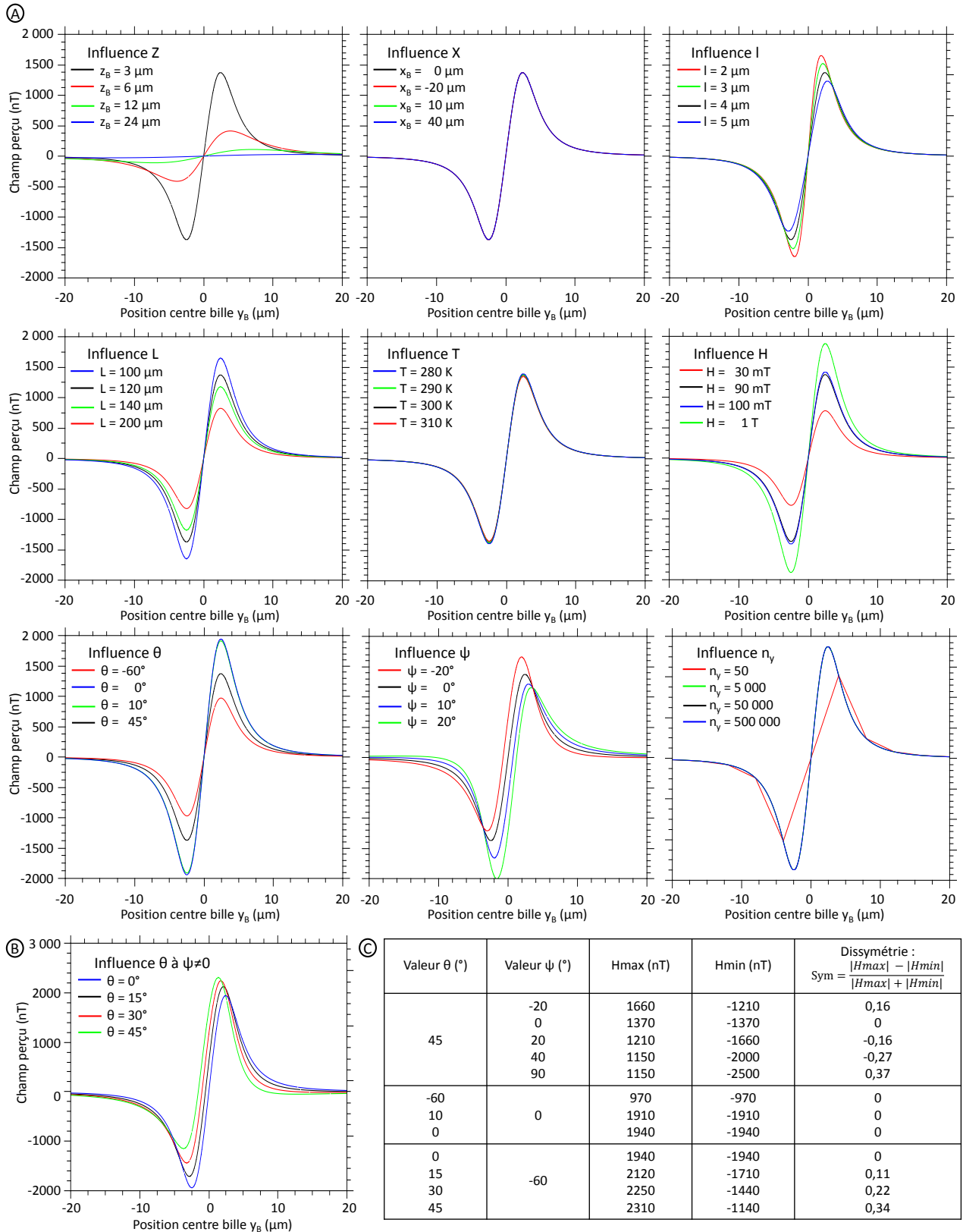


FIGURE 3.2 – A) Résumé de l'influence des différents paramètres sur les signaux émis par le capteur. La courbe référence présente dans tous les schémas est en noir, ses paramètres sont donnés par la colonne « Valeurs par défaut » du Tableau 3.1. B) Influence de θ sur la forme des signaux lorsque ψ est fixé non nul (-60°). C) Récapitulatif des simulations effectuées sur les angles et leur influence sur la forme du signal.

Paramètre testé	Valeur par défaut	Autres valeurs testées	Effet sur l'amplitude	Effet sur la largeur	Effet sur la dissymétrie
z_B (μm)	3	6; 12; 24	Forte diminution	Faible diminution	Aucun
x_B (μm)	0	-20; 10; 40	Aucun	Aucun	Aucun
L (μm)	120	100; 140; 200	Faible diminution	Aucun	Aucun
l (μm)	4	2; 3; 5	Diminution	Faible augmentation	Aucun
T (K)	300	280; 290; 310	Très faible diminution	Aucun	Aucun
H (T)	0.09	0.03; 0.1; 1	Augmentation	Aucun	Aucun
θ ($^\circ$)	45	0; 10; -60	Diminution	Aucun	Aucun
ψ ($^\circ$)	0	-20; 20; 40	Faible diminution	Aucun	Augmentation
n_y	50000	50; 5000; 500000	Augmentation	Diminution	Variable

Tableau 3.1 – Paramètres testés par le programme et résultats qualitatifs. Les influences observées sont données pour un paramètre dont la valeur augmente. Seuls les angles ont une influence sur la dissymétrie, s'ils sont tous les deux non nuls.

l'objet z_B dans le canal est le paramètre qui modifie le plus le signal. Plus un objet est proche du capteur, plus son signal a une forte amplitude et est étroit. La position latérale (suivant x) de la bille par rapport au centre du capteur x_B , en revanche, ne modifie pas le signal. Ceci s'explique par le fait que le capteur est très large selon l'axe x et dépasse de chaque côté du canal microfluidique, faisant en sorte que les billes ne passent jamais au bord de ce capteur. Ainsi, quelle que soit la position de la bille selon cet axe, la même proportion du capteur perçoit les mêmes variations de champ, voir Fig. 3.3 A. L'augmentation de la longueur L et/ou de la largeur l du capteur entraîne la diminution de la sensibilité car la surface utile diminue par rapport à la surface totale du capteur. D'autre part l'augmentation de la largeur a pour effets d'élargir les signaux et de diminuer le bruit des capteurs. En effet, la contribution principale au bruit considéré ici est le bruit thermique (Chapitre 1). Or, sa densité spectrale s'écrit : $S_{th} = 4k_B T R$, où la résistance R du dispositif s'exprime selon la formule : $R = \frac{\rho L}{le}$. Ainsi, d'après ces deux formules, si la largeur l du capteur augmente ou si sa longueur L diminue, R diminue et par conséquent le bruit thermique aussi. (L'épaisseur e et la résistivité ρ du capteur sont considérées ici comme des paramètres fixés car ils ne varient qu'avec la composition des couches magnétiques.) Cependant, le rapport L/l doit être suffisamment élevé afin que la réponse du capteur soumis à un signal magnétique, soit linéaire (§1.2.3). Par ailleurs, le capteur doit couvrir la totalité de la largeur du canal afin d'optimiser la détection des signaux émis par les objets magnétiques qui se déplacent dans ce canal. Un canal de $100 \mu\text{m}$ de large ayant été choisi, un capteur de $120 \mu\text{m}$ de long et de $4 \mu\text{m}$ de large est un bon compromis. Les dimensions du capteur sont représentées sur la Fig. 3.3 B.

D'après les équations (3.6) et (3.5), l'angle moyen θ_0 du moment magnétique d'une bille avec l'axe z (axe du champ magnétique \vec{H}) dépend directement de la température T et de la norme H du champ magnétique imposé. Plus la température est élevée plus l'angle θ_0 est grand. En revanche, plus le champ magnétique appliqué est grand, plus l'angle θ_0 diminue. Le moment magnétique tend à s'aligner dans la direction du champ, les signaux détectés sont donc d'autant plus grands que l'angle θ_0 est faible. L'influence des angles du moment magnétique peut aussi être étudiée directement. Ainsi, en faisant varier les angles selon z et selon x du moment, des effets un peu plus complexes sont constatés sur les signaux. Ces angles ont une influence sur la symétrie du signal, ce qui modifie également l'amplitude et la largeur de ces signaux de façon non triviale. Un schéma montrant ces deux angles est donné Fig. 3.3 C et les résultats des simulations les faisant varier sont présentés sur la Fig. 3.2. Si ψ est nul, la seule influence de l'augmentation de θ est de diminuer l'amplitude du signal, comme expliqué précédemment. En revanche, lorsque ψ est fixé à une valeur donnée non nulle, le calcul se complexifie (voir équation (3.2)) et la symétrie du signal est modifiée comme présenté sur la Fig. 3.2 B, pour laquelle ψ a été fixée à 60° . L'influence de θ peut aussi être étudiée (voir Fig. 3.2 B et C).

Comme le champ magnétique appliqué dans notre expérience est de 0.09 T, la courbe d'aimantation en

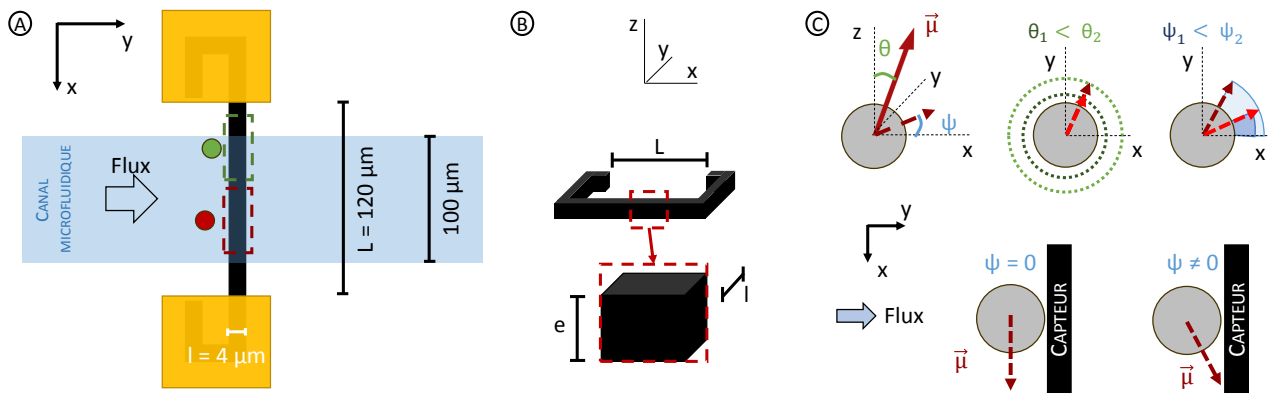


FIGURE 3.3 – A) Passage de deux objets aimantés dans le canal. Les portions utiles du capteur sont indiquées en pointillés pour chacun des deux objets. Quelle que soit la position des objets dans le canal, le capteur perçoit les mêmes variations. Les dimensions du canal et du capteur sont indiquées. B) Dimensions en 3 dimensions du capteur. C) Angles ψ et θ du moment avec l'axe z et l'axe x respectivement. Le projeté de ce vecteur sur le plan xOy du capteur est donné selon différentes valeurs des deux angles. La valeur de θ fixe la norme de ce vecteur projeté.

fonction du champ obtenue grâce au VSM (voir §2.1) montre que, pour cette valeur de champ magnétique, les Dynal ont un moment moyen de $1.6 \cdot 10^{-11}$ emu/bille, alors que leur moment à saturation est de $2.1 \cdot 10^{-11}$ emu/bille. On peut déduire de cette mesure que l'angle moyen θ_0 est de 45° . Les simulations peuvent être faites en fixant θ à cette valeur d'équilibre. En effet, chaque boule étant composée d'un grand nombre de nanoparticules, il semble cohérent que l'angle moyen par rapport à la verticale soit l'angle moyen de la distribution. L'angle ψ , en revanche, n'a pas de valeur privilégiée dans le système de l'expérience, et dans la suite des simulations ce paramètre sera donc tiré au hasard.

Enfin, le paramètre n_y qui correspond au nombre de pas dans le programme peut être interprété de deux manières différentes. Si la vitesse de l'échantillon simulé est considérée fixe, ce paramètre représente la fréquence d'acquisition utilisée lors d'une expérience. Au contraire, si cette fréquence est considérée fixe, il correspond à la vitesse de déplacement dans le canal.

La vitesse de passage et la fréquence d'acquisition sont effectivement étroitement liées. La fréquence d'acquisition doit être adaptée à la vitesse de déplacement des échantillons afin d'avoir un nombre de points minimum enregistrés par signaux, garantissant une reconstruction sans déformation des pics. Cette condition doit être respectée quelle que soit la vitesse de l'objet qui se déplace au-dessus du capteur. Dans un canal microfluidique, la vitesse a un profil parabolique. De grandes différences de vitesses sont donc observées selon qu'un objet se déplace au centre ou au niveau des parois de ce canal. L'écoulement laminaire de l'échantillon dans le canal est étudié plus en détails dans le §3.2.2, mais la vitesse moyenne de l'écoulement est d'environ 8 cm/s dans nos conditions expérimentales, décrites au §4.3. Une simulation à 5000 points sur 100 μm , valeur par défaut, est donc largement suffisante, correspondant à un enregistrement de 4 millions de points par seconde.

3.1.2 Agrégats

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, chaque bille simulée possède un moment $\vec{\mu}$ connu formant un angle θ_0 connu avec l'axe z (axe du champ magnétique appliqué). En toute rigueur, chaque moment de bille forme un angle ψ aléatoire avec l'axe x mais dans ce modèle cet angle est fixé à 0 pour plus de simplicité et une meilleure compréhension de l'influence des 3 autres paramètres :

- la hauteur de passage de l'agrégat z_A ,
- le nombre de billes N_B dont il est formé
- la façon dont ces billes sont arrangées entre elles

Les agrégats réels qui ont été observés peuvent avoir des formes assez allongées (chaines) ou des arrangements

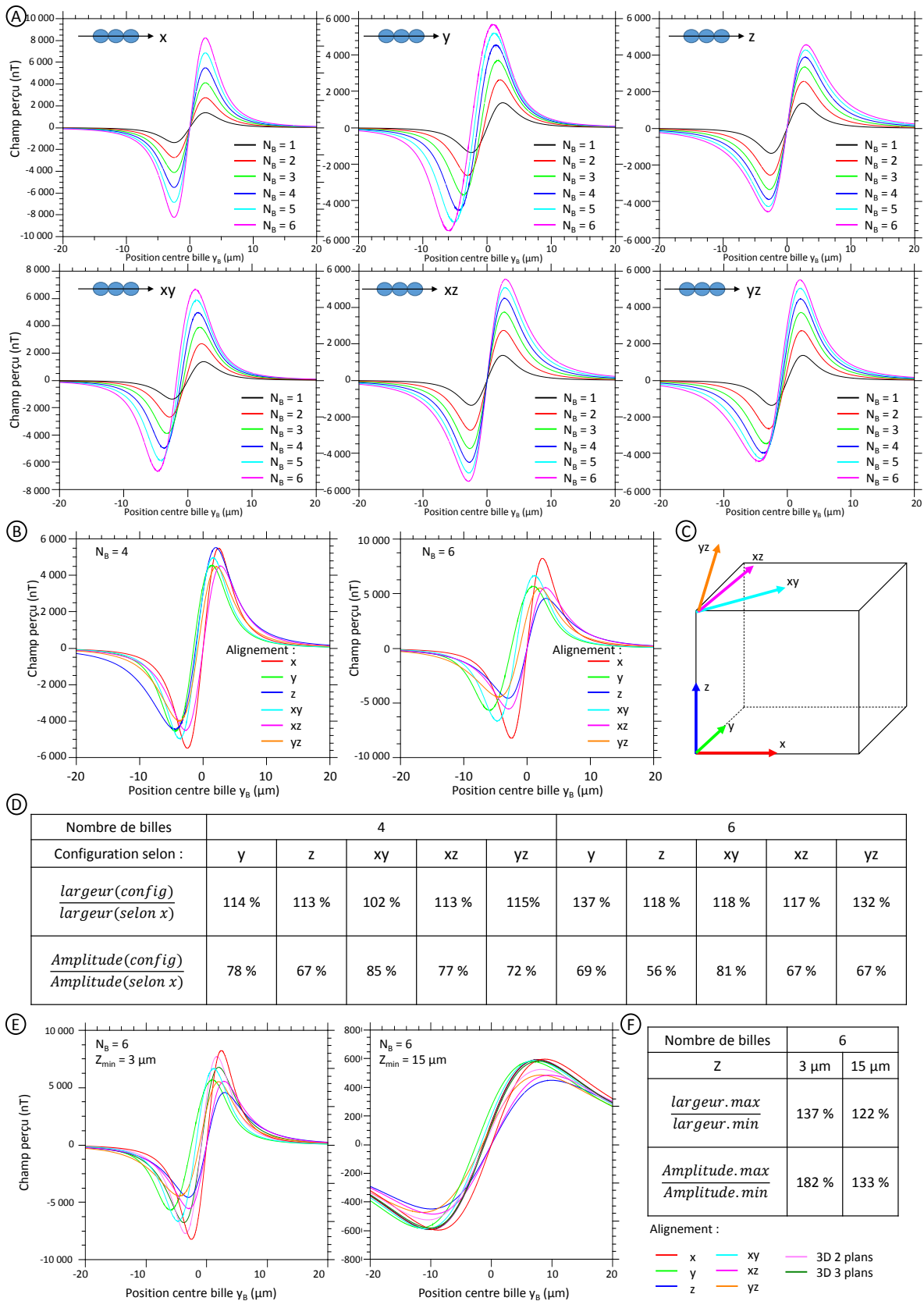


FIGURE 3.4 – A) Influence du nombre de billes par agrégat linéaire selon l’axe de cet agrégat. B) Influence de l’axe d’un agrégat linéaire constitué de 4 et de 6 billes. C) Visualisation des axes. D) Résumé des influences des configurations linéaires sur les largeurs et amplitudes des signaux. E) Influence de l’arrangement de 6 billes dans un agrégat à 3 ou 15 μm de haut. F) Pour ces deux cas, rapport entre le signal le plus fort et le plus faible puis entre le signal le plus large et le plus étroit.

compacts, et, lorsqu'ils sont formés de plus de 5 billes, des arrangements en trois dimensions sont courants. Les simulations ont été faites en sommant le champ créé par chaque bille sur le capteur pour chaque position de l'agrégat. Dans les simulations, les différentes géométries d'agrégats ci-dessus ont été considérées. Des calculs ont d'abord été réalisés en considérant un arrangement linéaire des billes (entre 1 et 6 billes) alignées selon les axes x , y ou z puis les axes médians des axes x et y , x et z et y et z nommés respectivement pour plus de concision xy , xz et yz (voir Fig. 3.4 C).

Ensuite, des formes compactes en deux dimensions (dans le plan xOy) ont été étudiées de la même façon aussi pour un nombre de billes variant de 1 à 6. Enfin des arrangements compacts de différentes formes en trois dimensions pour un nombre de billes variant entre 5 et 8, toujours dans les mêmes conditions. Cette étude permet d'évaluer la variabilité des signaux obtenus en fonction des diverses géométries des agrégats formés avec un même nombre de billes.

La Fig. 3.4 A présente l'influence du nombre de billes pour chaque configuration linéaire testée. Sur cette figure il est très clair que l'alignement selon x des billes augmente beaucoup plus le signal que leur alignement selon z pour une même hauteur minimum ($3 \mu\text{m}$ ici). L'influence de l'alignement selon y (et z dans une moindre mesure) sur la largeur des signaux est aussi visible. La Fig. 3.4 B et D compare les différentes configurations pour un même nombre de billes et calcule le pourcentage d'erreur fait dans chaque cas entre l'état en question et l'état de référence (alignement selon x) à la fois sur la largeur et sur l'amplitude des signaux. L'alignement selon x a été choisi comme état de référence car il revient à multiplier le signal d'une bille centrée par le nombre de billes. La Fig. 3.4 E présente l'influence de l'arrangement des billes dans un agrégat de 6 billes à 3 et 15 μm de haut. La Fig. 3.4 F donne le rapport d'amplitude entre le signal le plus fort et le plus faible obtenu dans l'ensemble de ces arrangements puis le rapport de largeur entre le signal le plus large et le plus faible. Pour une hauteur 3 μm , les signaux sont déjà tous du même ordre de grandeur et, pour une hauteur 15 μm , les écarts se resserrent. Des écarts importants (de l'ordre de 80%) peuvent apparaître pour les plus gros agrégats entre les différentes configurations à faible hauteur. Les signaux de plus larges écart-types sont ceux provenant des arrangements en chaînes selon y (axe de sensibilité du capteur) tandis que les signaux de plus forte amplitude sont ceux en chaînes selon x , et que les empilements selon z donnent les signaux de plus faible amplitude. Ces cas extrêmes ne paraissent cependant pas être les plus probables.

Il est indispensable de comprendre les effets des différents paramètres mis en jeu sur les signaux. Cependant, pour interpréter les données d'une expérience réelle, il est nécessaire de limiter le nombre de paramètres variables.

Ainsi, au cours de cette thèse, les agrégats de billes sont considérés comme ponctuels avec un moment magnétique qui est N_B fois le moment magnétique des N_B billes qui le constituent. Cette modélisation a tendance à surestimer l'amplitude et à sous-estimer la largeur des signaux obtenus. En effet, l'étalement des objets selon l'axe y de sensibilité des capteurs est totalement négligé dans ce modèle, minimisant alors la largeur des signaux. D'autre part, l'étalement selon z des billes étant également négligé, elles sont toutes au plus proche du capteur, maximisant l'amplitude obtenue pour les agrégats de N_B billes à une hauteur donnée. L'ajustement par ce modèle aura donc tendance à sous-estimer le nombre de billes (proportionnel à l'amplitude des signaux) et la vitesse de l'agrégat détecté (déterminée à partir de la largeur des signaux).

3.1.3 Cellules

L'objet d'intérêt de cette thèse, qui est la cellule, est certainement le plus complexe à modéliser. En effet, la taille de l'objet (entre 6 et 12 μm de diamètre) et donc la distance entre deux billes à sa surface est du même ordre de grandeur que la distance capteur-objet (d'une petite vingtaine de μm en moyenne). Une modélisation tenant compte du côté aléatoire de la labélisation a été envisagée. Dans cette hypothèse, les N_b billes (points de moment $\vec{\mu}$ dont l'angle avec la verticale θ est fixé à leur valeur moyenne θ_0 et l'angle ψ avec l'axe x est tiré au sort) sont réparties sur la surface sphérique de rayon R_c de la cellule selon des angles α , selon la verticale, et β , selon l'axe x , aléatoires. Quelques exemples de configurations sont schématisés sur la Fig. 3.5 B.

Les simulations ont été faites en sommant le champ créé par chaque bille sur le capteur pour chaque position

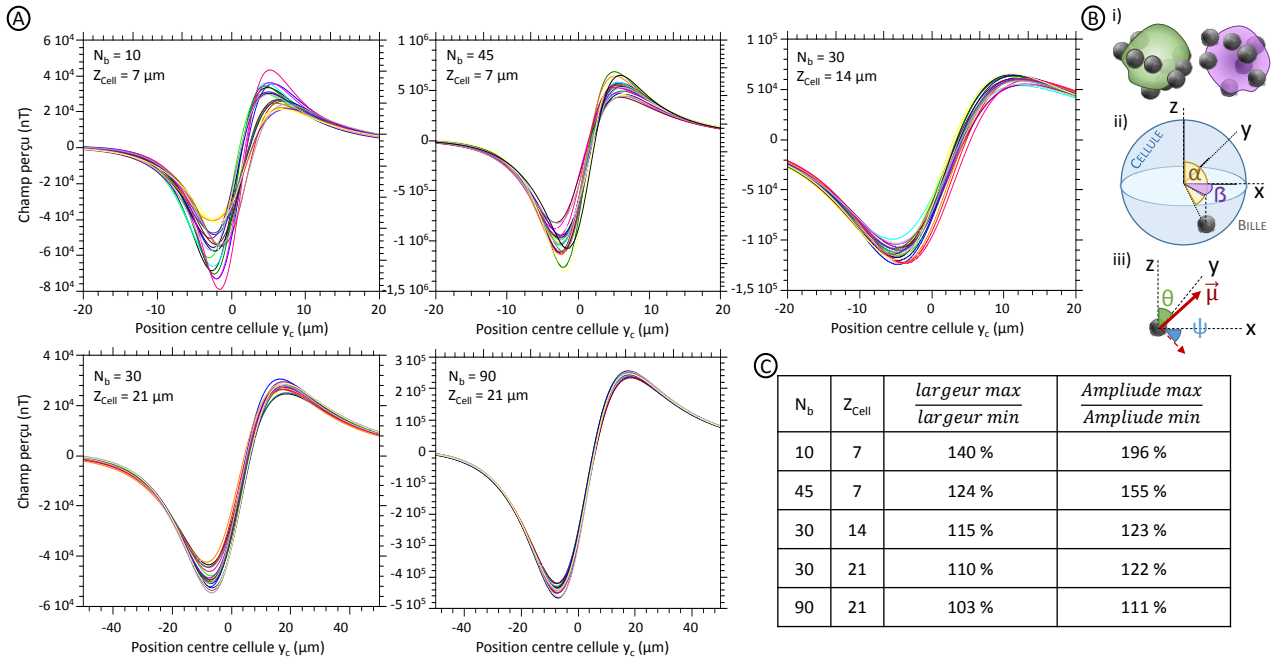


FIGURE 3.5 – A) 20 tirages aléatoires de la position des billes sur les cellules et de l'orientation de leur moment magnétique (angle ψ) pour différentes conditions de hauteur de la cellule Z_{Cell} et de nombre de billes N_b . B) i) Représentation schématique de 2 tirages aléatoires. ii) Représentation schématique du positionnement d'une bille à la surface d'une cellule selon les angles α et β . iii) Représentation schématique du moment d'une bille avec ses angles θ et ψ . C) Rapport entre le signal le plus fort et le plus faible puis entre le signal le plus large et le plus faible des 20 tirages pour chaque condition.

de la cellule. Les billes sont modélisées avec les caractéristiques des MP choisies ($\mu = 2.1 \cdot 10^{-11}$ emu/bille et $\theta_0 = 45^\circ$). Vingt tirages ont été effectués dans douze conditions distinctes de hauteur et de nombre de billes ($N_b = 10, 30, 45$ et 90 et $Z_{Cell} = 7, 14$ et $21 \mu\text{m}$) afin de distinguer l'importance relative des différents paramètres. Les signaux des tirages de cinq de ces douze conditions sont donnés Fig. 3.5 A. La variabilité des signaux d'un même objet selon le tirage au sort peut être évaluée en calculant les écarts les plus grands obtenus en termes d'amplitude et de largeur sur les 20 tirages, comme dans l'étude menée sur les agrégats. Parmi les vingt signaux obtenus, il s'agit de diviser l'amplitude maximale par la plus faible, et la largeur du signal le plus large par celle du signal le plus étroit. Ces rapports ont été calculés pour toutes les conditions présentées et leurs résultats sont donnés Fig. 3.5 C.

Les signaux émis par des cellules ayant le même type de marquage (même nombre de billes) peuvent avoir des largeurs et des amplitudes très différentes. Cependant, à une hauteur fixée, les cellules les mieux marquées semblent avoir des signaux assez reproductibles. D'autre part, l'augmentation de la hauteur de passage de l'objet semble réduire efficacement les écarts observés.

3.1.4 Bilan des simulations des trois objets

Les signaux générés par une bille dépendent principalement de leur hauteur z_B par rapport au capteur, de leur moment magnétique à saturation μ , de l'angle moyen de ce moment avec l'axe z θ_0 et de l'angle ψ de ce moment avec l'axe x . Pour un type de billes défini, $\vec{\mu}$ et θ_0 sont considérés ici comme des valeurs fixes à température et champ magnétique appliqué donnés. En fixant ces deux paramètres, la hauteur du passage d'une bille seule influe beaucoup sur l'amplitude et faiblement sur la largeur de son signal. L'angle ψ détermine la symétrie du signal obtenu. Pour les agrégats comme pour les cellules, le nombre de billes dont ils sont constitués et les positions précises des billes les unes par rapport aux autres sont deux paramètres supplémentaires qui influent sur le signal. La configuration des billes au sein de ces objets est évidemment impossible à prévoir ou à imposer.

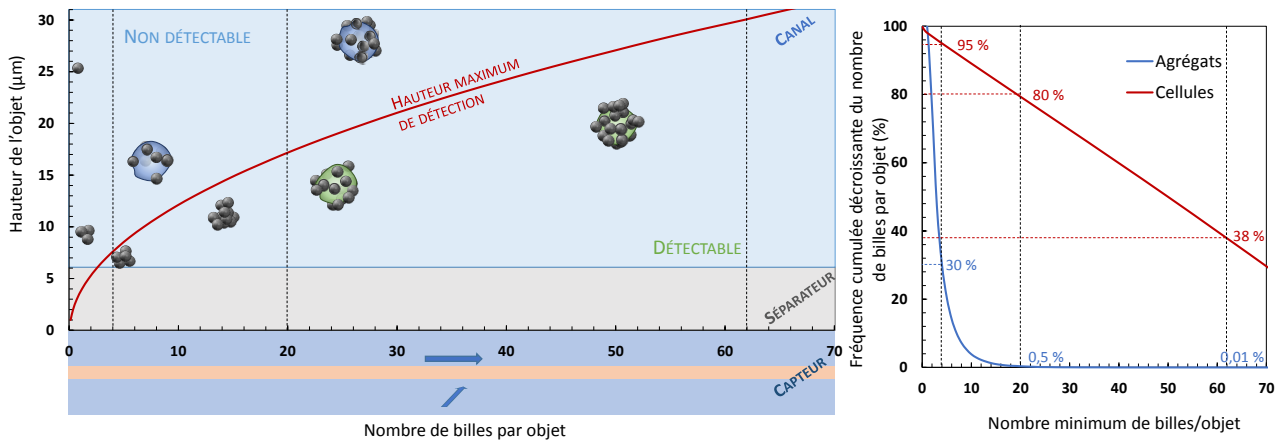


FIGURE 3.6 – Hauteur maximum de détection des objets selon le nombre de billes dont ils sont composés. Les plus petits agrégats (moins de 4 billes) ne sont jamais visibles, des agrégats de taille plus importante (comme 10 billes) peuvent être détectés sur quelques micromètres mais, pour être détectables sur tout le canal une soixantaine de billes sont nécessaires. La répartition des billes sur les cellules et dans les agrégats est représentée pour comparaison.

Enfin, le dernier paramètre dont il faut tenir compte, est la vitesse de passage des objets au-dessus du capteur, qui agit sur la largeur des signaux obtenus. (Dans les simulations présentées, les largeurs de signaux sont en μm et donc indépendants de la vitesse, mais les signaux réels seront mesurés en fonction du temps).

Cette grande variabilité empêche toute prétention d'une identification possible des objets à partir de l'enregistrement d'un seul signal. En effet, un même objet (une cellule labélisée par 20 billes par exemple) peut donner des signaux très différents suivant la position relative de ses billes, sa hauteur dans le canal, sa vitesse de passage et l'angle ψ que son moment fait avec l'axe x .

Il est cependant intéressant de noter que cette variabilité du signal a tendance à diminuer avec l'augmentation de la hauteur de l'objet détecté et surtout avec le nombre de billes qu'il contient.

Finalement, la forme des signaux est principalement contrôlée par le nombre de billes de l'objet détecté et sa hauteur. Le nombre de billes est corrélé au type d'objet et est le paramètre à déterminer pour avoir un test spécifique. Pour cela, il est indispensable de minimiser le plus possible l'influence de la hauteur sur les signaux.

3.2 Géométrie adoptée

3.2.1 Bilan des simulations

Pour que la détection soit spécifique, le capteur GMR doit détecter les cellules marquées par les Dynal (de $1 \mu\text{m}$ de diamètre) et pas les billes individuelles ni les agrégats. La distinction doit se faire à partir du nombre de billes par objet. Dans le Chapitre 2, les billes ont été étudiées en détails. En particulier, les distributions des billes dans les échantillons positifs et négatifs ont été déterminées. Par exemple, plus de 95% des cellules des échantillons positifs sont labélisés par au moins 4 billes alors que seuls 30% des agrégats ont plus de 4 billes. D'autre part, les capteurs des dispositifs un étage ont classiquement un seuil de détection de l'ordre de $1 \mu\text{T}$. La Fig. 3.6 permet de visualiser l'ensemble de ces données afin de concevoir un laboratoire sur puce permettant d'optimiser le nombre de cellules détectées tout en réduisant la détection des agrégats.

La hauteur du canal doit être minimisée. En effet, la hauteur de passage des objets a une influence majeure sur la forme des signaux, or, plus la hauteur du canal est faible, moins les différents objets ont des hauteurs de passages différentes. Cependant, le canal doit être suffisamment haut pour éviter tout bouchage, un compromis doit donc être trouvé. Les expériences préliminaires (décrites au §4.2.3) ont permis de démontrer qu'un canal de $25 \mu\text{m}$ était suffisant pour l'écoulement. Les puces ont donc été conçues avec des canaux de $25 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. La courbe de la hauteur maximum de détection d'un objet en fonction de son nombre de billes pour une détectivité

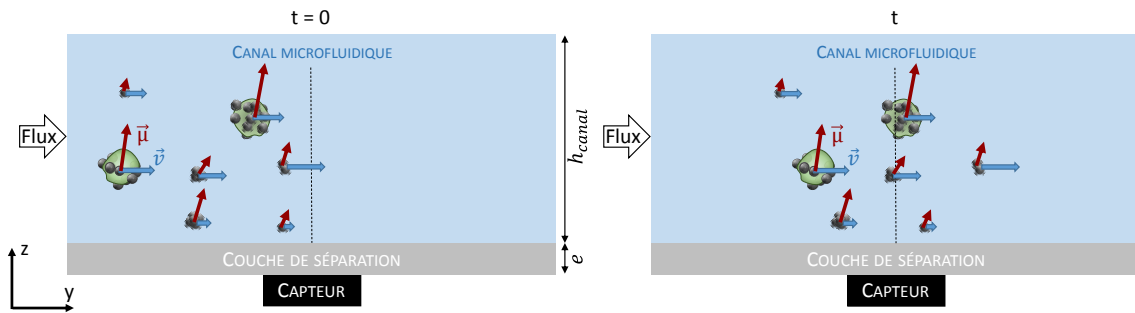


FIGURE 3.7 – A $t = 0$ l'ensemble des objets de l'échantillon (cellules marquées, billes et agrégats) sont générés dans le canal microfluidique, en amont du capteur. Leur position et l'angle ψ (non représenté explicitement) de leur moment $\vec{\mu}$ avec l'axe x sont tirés au hasard. Leur vitesse est alors déterminée selon la position de leur centre en supposant un profil parabolique des vitesses. La simulation commence alors en calculant à chaque pas, la nouvelle position de chacun des objets.

donnée ($1 \mu T$ dans cet exemple) est tracée sur la Fig. 3.6. En mettant en parallèle les courbes de répartition des billes dans les échantillons positifs et négatifs, il apparaît que la discrimination entre les objets spécifiquement marqués et les agrégats s'améliore avec la hauteur des objets. L'ajout d'une couche séparatrice entre le capteur et le bas du canal d'une épaisseur d'environ $6 \mu m$ paraît être une bonne solution pour s'affranchir des billes individuelles et des petits agrégats. En effet, à $7 \mu m$ du capteur, seuls les objets de plus de 4 billes pourront être détectés (95% des cellules et 30% des agrégats). En haut du canal, à $30 \mu m$ du capteur, seuls les objets de plus de 62 billes pourront être détectés (environ 40% des cellules et moins de 0.01% des agrégats). Enfin, au milieu du canal, à $17 \mu m$ du capteur, seuls les objets de plus de 20 billes sont détectables ce qui représente environ 80% des cellules et moins de 0.5% des agrégats.

Augmenter la hauteur du canal c'est aussi accepter qu'une plus grande proportion des objets soient indétectables, donc perdre des événements associés au passage de cellules et donc diminuer la sensibilité du test. Diminuer la hauteur de la couche de séparation, c'est augmenter le nombre d'évènements non spécifiques comptés et donc diminuer le ratio nombre d'évènements spécifiques/nombre total d'évènements. Augmenter le seuil de détection revient à augmenter le nombre minimum de billes pour être détectable pour chaque hauteur considérée. Le seuil le plus pertinent devra être déterminé lors des expériences.

3.2.2 Modélisation du passage des objets

Afin de mieux comprendre les résultats, un modèle du passage d'une suspension réelle dans le canal a été développé. Son principe est schématisé sur la Fig. 3.7.

La suspension négative typique contient $1.5 \cdot 10^7$ Dyna1/mL (correspondant à $23 \mu g/mL$ de Dyna1 fonctionnalisées par l'anticorps IpaD315) qui peuvent être réparties ainsi :

- 24% billes seules,
- 76% d'agrégats de billes (composés de 2 à 10 billes) selon la répartition établie expérimentalement au §2.3.2.

La suspension positive typique contient $1.5 \cdot 10^7$ billes/mL et 10^5 NS1/mL réparties ainsi :

- 10^5 cellules avec des niveaux de labélisation (entre 5 et 100 billes) selon la répartition établie expérimentalement au §2.3.1.
- 24% des billes restantes (non à la surface d'une cellule) sont isolées,
- 76% des billes restantes (non à la surface d'une cellule) participent à la formation d'agrégats de billes (entre 2 et 10 billes)

Le flux dans le canal microfluidique, de dimensions w_{canal} selon x , L_{canal} selon y et h_{canal} selon z , est supposé laminaire avec un profil parabolique des vitesses colinéaires à l'axe y [106] et surélevé d'une hauteur e par rapport au capteur. A l'instant t_0 , la position (x_0, y_0, z_0) de chacun de ces objets dans le canal et l'angle ψ de

leur moment sont générés aléatoirement. x_0 est compris entre $-w_{canal}/2$ et $w_{canal}/2$, z_0 est compris entre e et $e + h_{canal}$, ψ est compris entre 0 et 2π et y_0 est compris entre -2 cm et 0. Ainsi, le volume d'échantillon modélisé (50 nL) permet de déduire les nombres de billes et de cellules à positionner. La durée de la simulation est fixée à 10 s. Pour les cellules, les positions des billes à leur surface est également tirée au sort. De plus, pour l'échantillon négatif, le nombre de billes total (750 en l'occurrence) est réparti en billes libres et agrégats ainsi (le pourcentage d'agrégats ayant ce nombre de billes est donné entre parenthèses) :

- 24% des billes sont des billes libres (ou 47% des agrégats sont constitués de 1 bille)
- 30 % des billes sont engagées dans des agrégats de 2 billes (30% des agrégats)
- 17 % des billes sont engagées dans des agrégats de 3 billes (11% des agrégats)
- 10 % des billes sont engagées dans des agrégats de 4 billes (5% des agrégats)
- 7 % des billes sont engagées dans des agrégats de 5 billes (3% des agrégats)
- 5 % des billes sont engagées dans des agrégats de 6 billes (2% des agrégats)
- 2 % des billes sont engagées dans des agrégats de 7 billes (0.8% des agrégats)
- 2 % des billes sont engagées dans des agrégats de 8 billes (0.5% des agrégats)
- 1.5 % des billes sont engagées dans des agrégats de 9 billes (0.4% des agrégats)
- 0.5 % des billes sont engagées dans des agrégats de 10 billes (0.3% des agrégats)

Pour l'échantillon positif, il a été considéré que 5 cellules étaient générées par tirage, chacune labélisée par un nombre différent de billes (5, 15, 45, 70 et 100), ce qui retire donc 235 billes à répartir entre les agrégats.

Ensuite, à chaque pas de temps de la simulation, chaque objet avance à une vitesse correspondant à celle calculée grâce à sa position dans l'écoulement en supposant un profil parabolique des vitesses. L'équation (3.7) donne la formule utilisée, où ΔP est la surpression appliquée à l'entrée du canal [106]. Un calcul préliminaire (résultats non présentés) a permis d'établir que dès $n=3$, la suite convergeait de façon satisfaisante, donc cette valeur a été gardée.

$$v_y(x_o, y_o, z_o) = v_0 \sum_{i=0}^{n=3} \frac{1}{(2i+1)^3} \frac{1 - \cosh(c_i x)}{\cosh(c_i w_{canal}/2)} \sin(c_i z) \quad (3.7)$$

$$c_i = \frac{(2i+1)\pi}{h_{canal}}$$

$$v_0 = \frac{4\Delta P h_{canal}}{\pi^3 \eta L_{canal}}$$

Les signaux de chaque type d'objet sont enregistrés séparément et sommés les uns aux autres pour une visualisation de ce que le capteur perçoit. Les courbes individuelles sont également gardées afin de pouvoir attribuer chaque pic à un objet.

De telles simulations ont été faites pour plusieurs épaisseurs de la couche de séparation ($e = 0, 3, 6$ et $9 \mu\text{m}$). Le Tableau 3.2 donne les statistiques faites sur 10 tirages réalisés pour un échantillon positif et un échantillon négatif aléatoires dans les 4 configurations. Evidemment, ces simulations très simplifiées ne prétendent pas prédire les expériences, mais elles permettent une visualisation assez précise des paramètres importants et des signaux obtenus pour différents objets passant ensemble. En effet, une grande limitation de ces simulations est que tous les objets sont générés au début puis s'écoulent selon un profil parabolique des vitesses. Le nombre d'objets en amont du capteur chute donc rapidement. Cette méthode a l'avantage d'être simple mais l'inconvénient que la plupart des événements passe dans la première dizaine de millisecondes.

La Fig. 3.8 A-C présente un exemple de résultat obtenu avec le canal sans couche de séparation pour un échantillon positif et un échantillon négatif. Pour l'échantillon positif, les résultats sont présentés sous la forme sommée (les contributions de billes, des agrégats et des cellules ne sont pas différenciées) et sous une forme identifiée (où les contributions des cellules sont tracées en une couleur différente de celle des agrégats et billes). Il est impossible de distinguer *a priori* les signaux provenant des différents objets. Il est, de plus, également impossible de distinguer l'échantillon positif de l'échantillon négatif.

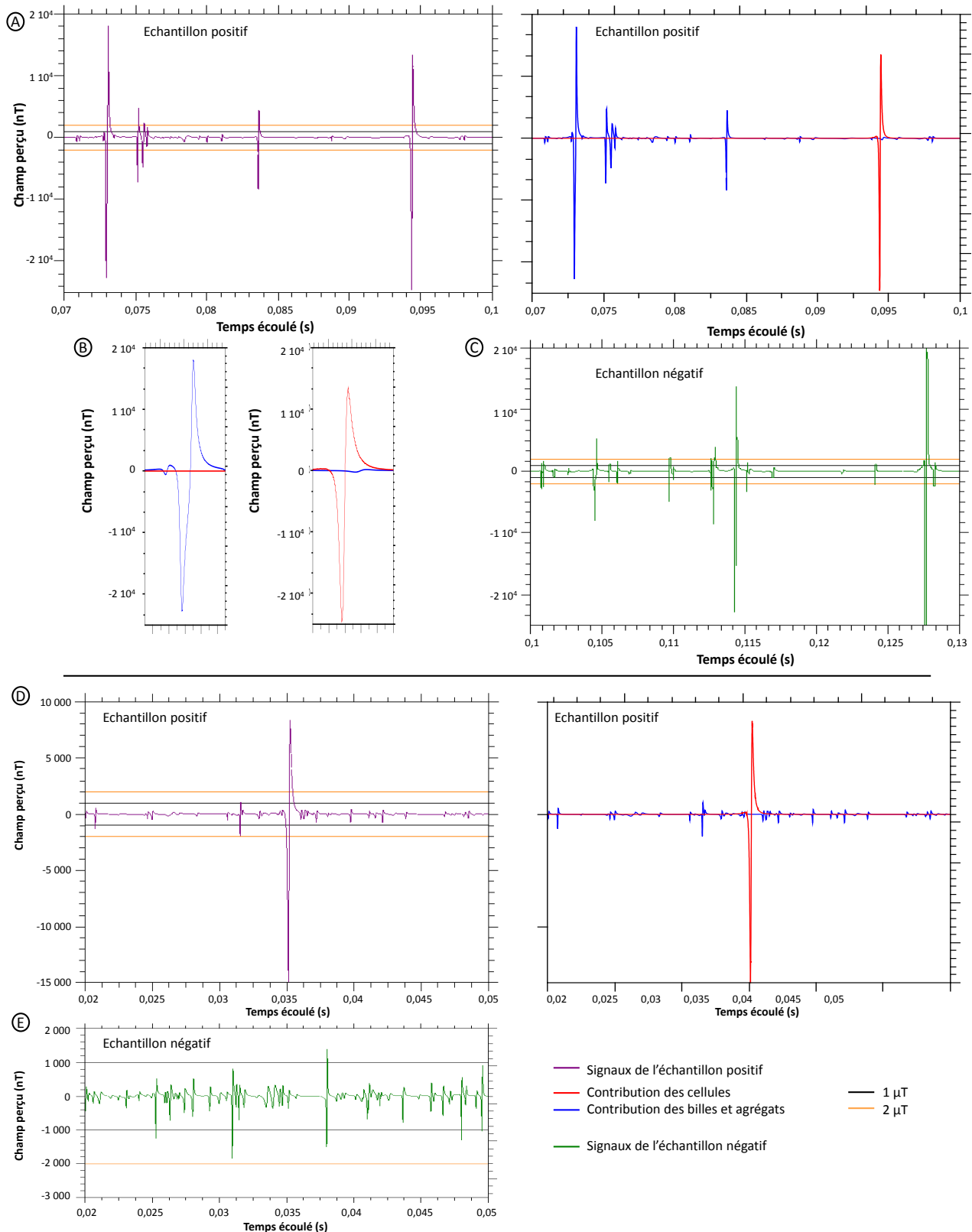


FIGURE 3.8 – Exemples d'écoulements simulés respectant les proportions en différents objets (billes, agrégats, cellules) dans un dispositif sans séparation entre le canal et le capteur (A-C) et dans un dispositif avec une séparation de $6 \mu\text{m}$ entre le canal et le capteur (D-E). A) Echantillon positif dans son ensemble puis contribution découplée des cellules et des billes dans le cas $e = 0$. B) Agrandissements d'un signal d'agrégat et d'un signal de cellule. C) Echantillon négatif dans le cas $e = 0$. Tous les graphiques de A à C sont représentés à la même échelle verticale : on ne distingue pas les signaux des cellules de ceux des billes ni les échantillons positifs des échantillons négatifs dans leur ensemble si $e = 0$. D) Echantillon positif dans son ensemble puis contribution découplée des cellules et des billes dans le cas $e = 6 \mu\text{m}$. E) Echantillon négatif dans le cas d'un passage dans le cas $e = 6 \mu\text{m}$. La distinction entre les deux types d'échantillons est nette dans le cas $e = 6 \mu\text{m}$.

Configuration	H_{seuil}	Signaux > H_{seuil}	Signaux > H_{seuil}	Ratio de cellules détectées
		Echantillons positifs	Echantillons négatifs	
0 μm	1 μT	595	753	88%
	2 μT	375	494	80 %
3 μm	1 μT	303	377	80%
	2 μT	125	154	56 %
6 μm	1 μT	102	112	30 %
	2 μT	30	15	30 %
9 μm	1 μT	22	29	20 %
	2 μT	5	1	10 %

Tableau 3.2 – Statistiques sur 10 tirages du nombre de signaux dépassant un seuil H_{seuil} donné selon la configuration considérée (l'épaisseur de la couche de séparation entre le canal et le capteur) du dispositif et le type d'échantillon. Chaque simulation modélise le système sur 2 s. Le canal fait 15 mm de long, 100 μm de large et 25 μm de haut et la pression appliquée à son entrée est fixée à 300 mbar.

En revanche, en ajoutant une épaisseur séparatrice, les échantillons positifs donnent plus de signaux que les échantillons négatifs au-delà d'un certain seuil dépendant de l'épaisseur. Dans le Tableau 3.2, la configuration idéale apparaît être celle d'une épaisseur de 6 μm et d'un seuil de détection de 2 μT . En effet, en-dessous de cette épaisseur, les échantillons négatifs donnent tous plus de signaux que les échantillons positifs quel que soit le seuil. D'autre part, même à cette hauteur, avec un seuil de détection trop bas, les signaux négatifs sont plus nombreux. Un seuil de 2 μT permet de diviser par 7 le nombre de signaux non spécifiques détectés tout en conservant la détection de toutes les cellules marquées par rapport à un seuil de 1 μT . La Fig. 3.8 D et E présente un exemple d'écoulement obtenu avec une séparation de 6 μm . Cette solution ne permet toujours pas d'attribuer un signal à un type d'objet en particulier (cellule marquée ou agrégat), mais elle répond au contrat de spécificité de la méthode en distinguant correctement les échantillons positifs des échantillons négatifs, au moins selon la théorie.

3.3 Conclusion

Afin d'optimiser la probabilité de faire une distinction nette entre les échantillons positifs et négatifs, les puces doivent être construites avec une épaisseur de 6 μm séparant le capteur du canal. D'autre part, le canal lui-même doit avoir une hauteur aussi faible que possible. Enfin, le seuil de détection devra aussi être choisi suffisamment haut pour augmenter le ratio nombre de cellules détectées/nombre d'évènements comptés. D'après nos calculs, un seuil aux alentours de 2 μT devrait convenir.

Chapitre 4

Expériences

Dans cette thèse, la mise en place des expériences comporte plusieurs étapes :

- Production les différents éléments nécessaires à leur réalisation (les laboratoires sur puces, les billes fonctionnalisées et les matrices biologiques testées).
- Réalisation des tests préliminaires pour déterminer les conditions optimales de réalisation.
- Réalisation des expériences.

D'autre part, l'objectif étant ici de développer et évaluer les performances d'un outil de diagnostic, des tests alternatifs standards de comparaison ont également été mis au point et réalisés.

4.1 Préparation du matériel

4.1.1 Production des laboratoires sur puces

Les laboratoires sur puce un étage sont composés de 9 capteurs GMR (trois capteurs de 2 μm de large, trois de 3 et trois de 4, tous font 120 μm de long) alignés sous un canal microfluidique et montés sur un circuit électrique.

Dépôt des couches GMR

Les dispositifs ont été produits avec les couches présentées au Chapitre 1.

La procédure complète de la fabrication des capteurs à partir de ces couches est illustrée dans la Fig.4.1. Elle est de plus résumée en Annexe L sous forme de protocole.

Fabrication des capteurs

Le principe de fabrication se décompose en trois étapes¹. D'abord, les capteurs sont gravés dans les couches GMR. Le wafer composé du substrat et de la couche GMR, est nettoyé à l'acétone et à l'isopropanol dans un bain d'ultrasons, puis séché sous flux d'azote. Il est ensuite recouvert de résine photosensible positive S-1805 étalée à la tournette (2 s à 500 RPM 300 RPM/s, 60 s à 4000 RPM 300 RPM/s et 2 s à 6000 RPM 1000 RPM/s) puis recuit 3 minutes à 110°C. La résine est alors insolée 10 s par une MJB4 (Karl Süss, 10mW/cm², 365 nm) à travers un masque en quartz contenant les motifs des capteurs (yokes) en chrome. Comme la résine est positive, lors du développement de 45 s dans du MF319, elle ne reste que sur les motifs (non insolés) des capteurs. Le wafer est rincé à l'eau déionisée, séché sous flux d'azote et recuit 3 minutes à 110°C. La couche GMR est ensuite gravée ioniquement (Plassy) pendant 20 minutes sur les parties sans résine. Après cette gravure, un lift off est réalisé. Cela consiste à dissoudre la résine qui protège les capteurs dans de l'acétone. Ensuite, les contacts électriques permettant de connecter les capteurs au reste du dispositif sont fabriqués. Le wafer contenant les yokes est à nouveau recouvert de résine positive photosensible S-1813 et étalée à la tournette

1. J'ai fabriqué quelques capteurs mais la majeure partie a été faite par Elodie Paul

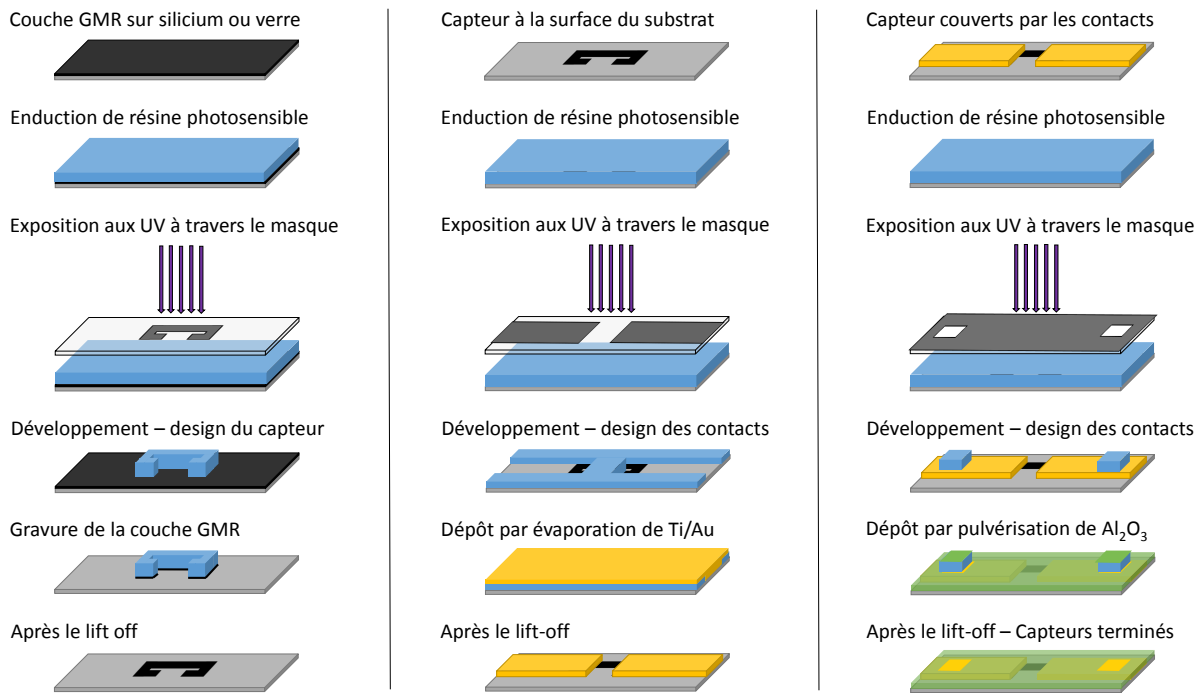


FIGURE 4.1 – Schémas présentant les trois grandes phases de la production des capteurs par des techniques de lithographie optique : gravure du capteur, dépôt des contacts par évaporation (Ti/Au) et dépôt de la passivation par pulvérisation (Al_2O_3 et Si_3N_4). Chacune de ces phases est divisée en six étapes clés.

selon le même programme. Il est recuit 3 minutes à 110°C avant d'être exposé à la MJB4 15 s à travers un masque en chrome contenant les motifs en quartz des contacts. Après le développement en MF319 de 45 s, le rinçage à l'eau et le séchage sous flux d'azote, il subit enfin un recuit de 3 minutes à 110°C . La résine disparaît au niveau des zones insolées (résine positive) c'est-à-dire au niveau des contacts. 10 nm de titane puis 150 nm d'or sont successivement déposés par évaporation dans un bâti de dépôt par épitaxie moléculaire (Plassy). Un lift off est à nouveau effectué pour enlever la résine encore présente en dehors des zones de contacts.

Il est ensuite nécessaire de passiver la surface des capteurs afin de les protéger de phénomènes comme l'oxydation. Le wafer contenant les capteurs et les contacts est soumis aux mêmes étapes de lithographie optique que celles décrites ci-dessus. La résine protège des plots de contact de part et d'autre de chaque capteur. 100 nm de Al_2O_3 sont déposés par pulvérisation dans un bâti de dépôt par épitaxie moléculaire. Dans le cas d'un laboratoire sur puce avec un canal microfluidique en PDMS, 100 nm de Si_3N_4 sont déposés par-dessus également par pulvérisation afin de faciliter l'adhésion du PDMS et d'assurer une meilleure tenue dans le temps des capteurs. Un dernier lift off est réalisé.

Production des canaux microfluidiques

Deux types de canaux microfluidiques ont été utilisés pendant la thèse. Durant les deux premières années, les canaux ont été fabriqués avec du polydiméthylsiloxane (PDMS), car c'est un matériau facile d'utilisation et couramment utilisé en microfluidique. Il présente cependant les inconvénients d'être assez poreux et son montage sur le capteur est irréversible.

Par la suite, les canaux ont été réalisés en SU-8 avec un capot de verre.

Canal en PDMS Le canal en PDMS est utilisé très classiquement en microfluidique [107–109]. Il présente l'avantage d'adhérer facilement à un substrat ayant une composition chimique proche de la sienne de manière covalente. Le canal est obtenu à l'aide d'un moule fabriqué préalablement. L'ensemble du protocole est résumé

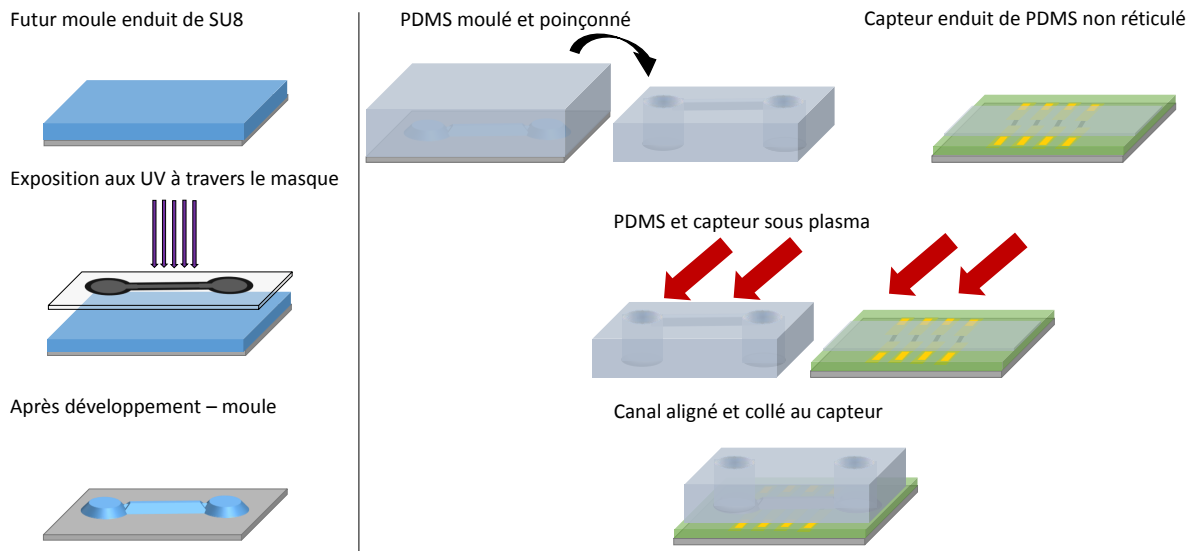


FIGURE 4.2 – Schéma du processus de fabrication des canaux en PDMS. Cette méthode simple et rapide, repose sur l'utilisation d'un moule réutilisable. Elle a été utilisée pendant les deux premières années de thèse.

dans le schéma représenté Fig. 4.2. Un wafer en silicium oxydé est lavé sous ultrasons successivement 3 minutes dans un bain d'acétone puis 3 minutes dans un bain d'isopropanol, il est ensuite déshydraté 10 minutes à 150°C puis enduit de résine SU-8 2005 étalée à la tournette (30 s à 4000 RPM 300 RPM/s et 2 s à 6000 RPM 800 RPM/s). Après un recuit 3 minutes à 100°C, il est exposé 20 s à la MJB4 sans masque et subit un second recuit 30 minutes à 150°C. Cette couche d'accroche est nécessaire pour que les moules résistent longtemps à l'arrachage du PDMS de leur surface. Pour un profil classique de 25 μm , le moule est enduit de SU-8 2025 à la tournette (5 s à 500 RPM 300 RPM/s, 30 s à 3000 RPM 300 RPM/s, 5 s à 6000 RPM 800 RPM/s). La résine négative est ensuite chauffée 3 minutes à 65°C et 5 minutes à 95°C puis exposée 15 s sous la MJB4 à travers un masque en quartz contenant les motifs des canaux en chrome. Un recuit post exposition de 1 min à 65°C et 5 minutes à 95°C précède un développement de 4 minutes en SU-8 developer. Le processus de fabrication doit être adapté en fonction des dimensions souhaitées selon le protocole commercial Annexe J. Les dimensions du moule sont ensuite confirmées par une mesure faite au profilomètre (KLA tencor). Un recuit final de 15 minutes à 150°C est appliqué pour obtenir un moule plus solide.

Le PDMS est préparé en mélangeant une base de PDMS avec un réticulant dans des proportions 10 :1 (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI). Le mélange homogène est dégazé sous vide pendant 1h. Le PDMS est ensuite versé dans le moule en SU-8 et laissé 1 nuit à 70°C. Une fois réticulé, le PDMS est démoulé, ses réservoirs sont percés avec un poinçon, sa surface est nettoyée au scotch puis à l'isopropanol avant d'être séchée sous un flux d'azote.

En parallèle, le capteur est lavé (acétone 3 minutes sous ultrasons, isopropanol 3 minutes sous ultrasons), déshydraté (10 minutes à 120°C) puis nettoyé au plasma (30 s à 100 W sous 0.2 mbar de dioxygène). Comme le PDMS n'adhère pas bien sur la couche de passivation en Si_3N_4 , une fine couche de PDMS dégazé mais non réticulé est étalée à la tournette sur la surface du capteur.

La vitesse programmée varie en fonction de l'épaisseur souhaitée (30 min à 6000 RPM pour moins d'un micromètre, 5 min à 2500 RPM pour une couche de 10 micromètres). Le capteur et le futur canal en PDMS subissent ensuite un plasma de dioxygène à 0.1 mbar, 40 W pendant 20 s. Immédiatement après (moins de 2 minutes), le canal est aligné sur les capteurs sous une binoculaire. La puce est finalement chauffée 10 minutes à 120°C et maintenue une nuit à 70°C pour assurer un collage optimal.

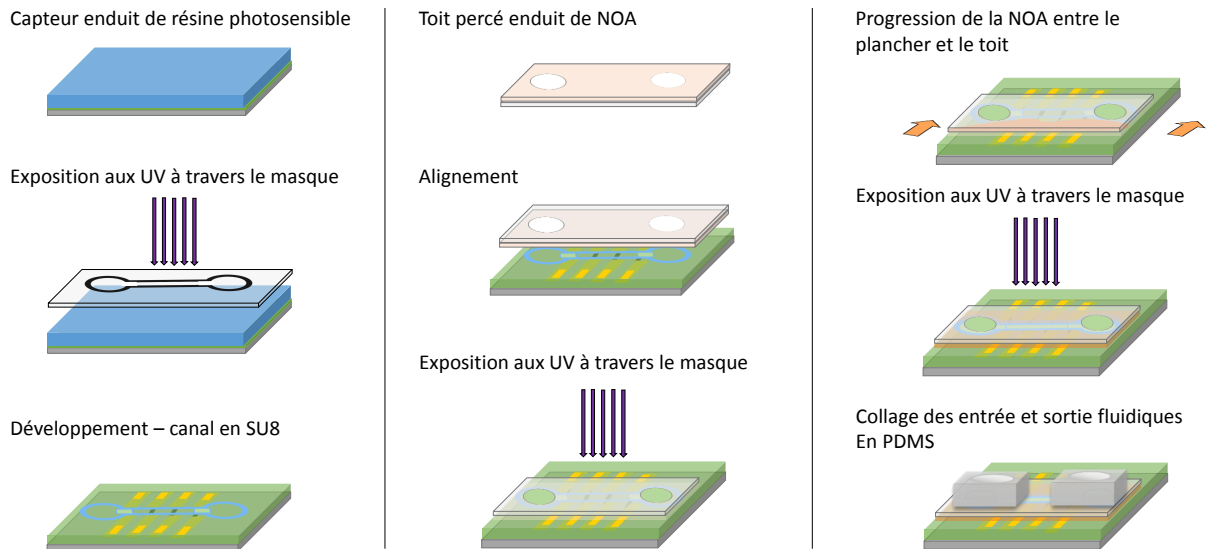


FIGURE 4.3 – Description schématique des différentes étapes de production d'une puce en SU-8. Ce protocole a été établi selon l'idée qu'une meilleure herméticité du dispositif s'obtient plus simplement lorsque le collage est effectué sur une faible surface. Les murs en SU-8 du canal sont obtenus par une photolithographie classique sur le plancher du dispositif, il est ensuite refermé par un toit enduit d'une fine couche de NOA. Enfin, la puce est consolidée par l'ajout de NOA qui est introduite entre les deux wafers et vient agrandir leur surface de contact.

Canal en SU-8 L'ensemble du protocole est résumé en schémas Fig. 4.3. Le canal est fait sur le capteur et repose sur une couche d'accroche comme suit. Après le lavage sous ultrasons de l'échantillon (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes), sa déshydratation (10 minutes à 120°C), et l'activation de sa surface par un plasma de dioxygène (30 s à 0.2 mbar, 100 W), la surface du capteur est enduite de SU-8 2002 à la tournette selon un programme dépendant de l'épaisseur souhaitée sous le bas du canal (Annexe I) (pour moins d'un micromètre : 120 s 6000 RPM 300 RPM/s). Un recuit de 3 minutes à 120°C est effectué avant une exposition sans masque à la MJB4 de 10 s. Un second recuit de 20 minutes à 120°C permet de fixer la couche d'accroche. Un second enduit est réalisé en SU-8 2025 à la tournette selon un programme dépendant de la hauteur du canal souhaité (5 s 500 RPM 300 RPM/s, 30 s 3000 RPM 300 RPM/s, 5 s 6000 RPM 800 RPM/s pour 25 μm). Les temps de recuit à 95°C (5 minutes pour 25 μm), d'exposition à travers le masque du canal (28 s pour 25 μm), de développement en SU-8 developer (4 minutes pour 25 μm) et de recuit final à 95°C (5 minutes pour 25 μm) dépendent aussi de cette épaisseur. Une mesure de la hauteur des canaux obtenue est alors réalisée grâce au profilomètre mécanique avant un recuit de 20 minutes à 120°C figeant la structure. Dans ce protocole, le canal est uniquement constitué de murs d'une largeur de 30 μm formant son squelette.

L'entrée et la sortie des capillaires vers le canal sont réalisés dans un capot de verre à la découpe LASER (EXCIMER). Pendant cette étape, le toit est protégé par une couche de résine photosensible non exposée. Après lavage sous ultrasons (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes), déshydratation (10 minutes à 120°C) et nettoyage au plasma (30 s à 0.2 mbar, 100 W), le capot est enduit à la tournette (80 s à 6000 RPM, 300 RPM/s) de quelques micromètres de Norland Optical Adhesive 81 (NOA). L'alignement des deux parties de la puce est fait sous MJB4, l'insolation de 20 s est réalisée en appliquant une légère surpression à l'assemblage. A ce stade, le canal est déjà formé et étanche mais la puce est fragile car collée seulement sur une faible surface (30 μm de large sur le contour du canal). Pour la consolider, du NOA est introduit entre les deux surfaces, au plus proche de l'un des deux réservoirs. Sa progression par capillarité le long des parois du canal est surveillée au microscope. Le tout est ensuite insolé 200 s à la MJB4 pour une réticulation totale. L'étape finale est le collage de PDMS poinçonné au niveau des entrées et sorties du canal afin de faire le joint étanche qui permettra de connecter la puce à un circuit fluide. La procédure est identique à celle décrite précédemment.

La principale difficulté de ce protocole est d'obtenir une bonne herméticité lors du collage initial. Pour cela,

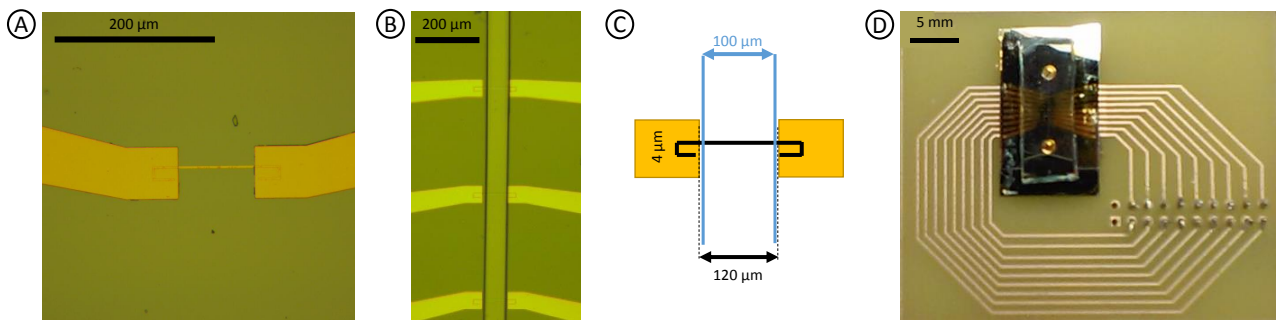


FIGURE 4.4 – Photographies et schéma du dispositif. Les échelles sont indiquées pour chaque photographie. A) Photographie d'un capteur en fin de fabrication. B) Photographie d'un capteur après alignement d'un canal en PDMS. C) Schéma présentant les longueurs et largeurs caractéristiques des yokes et la largeur du canal. D) Photographie du dispositif complet.

les surfaces mises en contact doivent être très planes d'où le collage initial sur une surface très faible. L'avantage de ce type de canal par rapport au PDMS est que toute erreur et tout bouchage du canal est réversible. Il est en effet possible de récupérer les capteurs déjà montés en les laissant dans l'acétone à 70°C pendant 4 jours. Le collage du PDMS sur le verre est une réussite 9 fois sur 10 avec les bons paramètres mais peut s'avérer insuffisant par temps trop sec. Le capteur est alors irrécupérable. Le montage en SU-8 a un taux de réussite de l'ordre de 6/10 mais les montages peuvent tous être remontés plusieurs fois.

Montage sur circuit imprimé

Les capteurs sont connectés électriquement grâce à un circuit imprimé appelé PCB (pour « Printed Circuit Board » en anglais).

Le principe est aussi celui d'une photolithographie. Le masque du PCB (encre noire traçant les pistes sur un transparent) est appliqué à la surface d'un PCB vierge enduit d'une résine photosensible sous-laquelle se trouve du cuivre. L'ensemble est exposé 35 s. Le développement permet de libérer les zones non désirées de leur résine. Le cuivre non protégé est alors rongé par une solution de chlorure de fer, ne laissant du cuivre qu'au niveau des pistes. Un rinçage en acétone puis en eau permet de nettoyer la résine restante. La puce est collée à la surface du PCB par de la cire chauffée à 110°C. Les soudures connectant les capteurs aux pistes de cuivre sont réalisées à l'aide d'une microsoudreuse à ultrasons (TPT wire bonder HB10) utilisant un fil d'aluminium de 50 µm d'épaisseur. Le résultat est présenté Fig. 4.4.

4.1.2 Culture cellulaire

Deux types de cellules eucaryotes ont été utilisés. Les cellules NS1 de myélome murin ont été notre modèle biologique tandis que les cellules ovariennes de hamster chinois CHO ont été utilisées pour les tests négatifs. Des photographies de ces deux types cellulaires sont présentés sur la Fig. 4.5. Ces deux lignées cellulaires ont été cultivées dans des milieux et avec des additifs achetés chez Gibco®, Life Technologies.

Cellules NS1

Les cellules NS1 sont cultivées en plaques 24 puits en milieu de culture classique de chez Dulbecco additionné de 15% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine), 1% de L-glutamine et 1% de pyruvate de sodium. Elles sont gardées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 7% de CO₂. Quelques jours avant leur utilisation, elles sont mises en expansion en plaques 6 puits

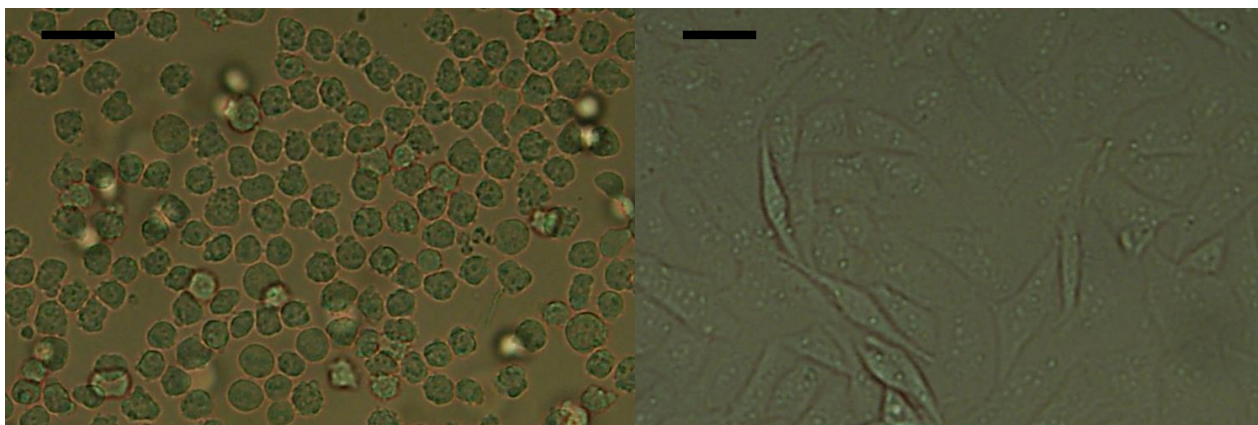


FIGURE 4.5 – Photographies au grossissement 20X de cellules NS1, non adhérentes, (à gauche) et de cellules CHO, adhérentes, (à droite). La barre d'échelle est de 30 μm .

dans un milieu de même composition ².

Cellules CHO

Les cellules CHO sont cultivées sur plaques de pétri traitées pour favoriser l'adhésion cellulaire. Elles sont cultivées en milieu Ham-F12 Nutrient Mixture de chez Dulbecco additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et 1% de L-glutamine. Elles sont gardées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂. Leur concentration est maintenue entre 10⁴ CHO/mL et 10⁶ CHO/mL pendant la durée de la culture ³.

4.1.3 Fonctionnalisation des billes magnétiques

Les Dynabeads®MyOne 1 μm streptavidine sont couplées à des anticorps biotinylés selon le protocole commercial (Annexe F). Ce protocole a été appliqué avec les deux anticorps utilisés : l'anti-CD138 (anticorps commercial de rat, d'isotype IgG2a) et l'IpaD315 (anticorps de souris produit au LERI, d'isotype IgG2a [98]).

Pour la biotinylation des anticorps, 100 μg d'anticorps sont dilués dans 400 μL de tampon borate 0.1 M pH 9.0. 6 μL de biotine en DMF à 1 mg/mL sont ajoutés à la solution (ratio de couplage = 20 molécules de biotine pour une molécule d'anticorps) et le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante. Ensuite, la réaction est stoppée par l'ajout de 100 μL de tampon Tris (trishydroxyméthylaminométhane) 1 M pH 8.0 pour une incubation de 15 minutes supplémentaires à température ambiante pour inactivation de la biotine n'ayant pas réagi avec l'anticorps. L'anticorps biotinylé est séparé de la biotine libre par passage sur colonne Zeba Desalt Spin (Thermo Scientific) en tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 7.4 additionné de 0.15 M de chlorure de sodium. La concentration finale est déterminée par spectroscopie via la loi de Beer-Lambert. L'absorbance de la solution est mesurée à 280 nm ($\text{abs}(280\text{nm})$) et 320 nm ($\text{abs}(320\text{nm})$), la concentration en anticorps est alors définie par l'équation :

$$[\text{Ac}] = \frac{\text{abs}(280\text{nm}) - \text{abs}(320\text{nm})}{E.l}$$

où [Ac] est la concentration en anticorps, E est le coefficient d'extinction molaire, dépendant uniquement de la nature du solvant et du soluté et l est la longueur de la cuve (ici, le produit E.l est égal à 1.48). Les anticorps biotinylés sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

2. J'ai appris à cultiver moi-même ces cellules, mais pendant une grande partie de ma thèse ce travail a été effectué par Karine Moreau, Marc Plaisance, Stéphanie Gelhaye et Quentin Baratte.

3. J'ai appris à cultiver moi-même ces cellules, mais pendant une grande partie de ma thèse ce travail a été effectué par Anne Wijkhuisen.

Finalement, conformément au protocole commercial, après trois lavages de 1 mg de billes en PBS, 20 µg d'anticorps biotinylés leur sont ajoutés et l'ensemble est incubé sous agitation à température ambiante durant 30 minutes. Les billes sont ensuite saturées et stockées en PBS 0.1% de BSA à 4°C jusqu'à utilisation.

4.1.4 Préparation de sérum et de plasma de lapin

Les tests médicaux sont couramment réalisés avec du plasma ou du sérum humain. N'ayant pas l'autorisation de manipuler ces échantillons humains au laboratoire, et afin de tester notre outil de diagnostic avec des matrices biologiques s'en rapprochant, du sérum et du plasma de lapin ont été préparés.

Sérum de lapin

Le sang, (environ 40 mL) collecté dans un bécher en verre à l'animalerie d'un lapin « naïf » (auquel aucun produit n'a préalablement été administré), est laissé à coaguler autour d'une pipette en verre pendant 30 minutes à température ambiante puis pendant une nuit à 4°C. Le coagulat est retiré et la solution restante est centrifugée 15 minutes à 2000 g. Le surnageant est récupéré et réparti en aliquots de 5 mL stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Plasma de lapin

Le sang (environ 40 mL) est collecté à l'animalerie d'un lapin naïf dans un tube Falcon de 50 mL contenant de l'Éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ou de l'héparine. Il est immédiatement centrifugé 15 minutes à 2000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et réparti en aliquots de 5 mL stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

4.2 Optimisations du laboratoire sur puce

Avant de réaliser les expériences complètes elles-mêmes, divers paramètres ont dû être optimisés. Ces étapes préliminaires, résumées dans le Tableau 4.1, ont permis de définir les laboratoires sur puce les plus susceptibles de donner les résultats souhaités.

Paramètre	Valeurs testées	Conclusions
Réservoir	Fluigent (aspiration par le haut)/ Réservoir vertical (aspiration par le bas)	Réservoir vertical plus adapté
Pression	50 mbar 100 mbar 150 mbar	Un flux trop lent favorise le bouchage
Agitation	Aucune Rotation du tube Moteur dans le réservoir	Faible efficacité et diminution de la survie des cellules
Lavage	eau DI PBS	Toujours des cellules après 20 minutes, aucune influence
Tapissage puce	Non Tapissage PBS + 1% BSA (4 h)	Aucune influence

Tableau 4.1 – Tests réalisés dans des puces de 1 mm de large avec des échantillons de 10⁵ NS1/mL par observations avec une caméra rapide. L'influence du type de réservoir, de la pression appliquée et de l'agitation sont évaluées par le nombre de cellules passant devant la caméra en un temps donné tandis que le lavage et le tapissage (saturation) par la BSA (censé rendre les parois moins adhérentes [110]) sont évalués par la présence de cellules après un lavage de 20 minutes.

4.2.1 Système fluidique

Au début de ma thèse, les échantillons étaient introduits dans le réservoir Fluigent qui aspire le liquide par le haut. La pression était réglée aux alentours de 100 mbar, le canal avait une hauteur de 35 à 50 μm et l'aimant permanent utilisé (Aimant initial) était un aimant néodyme-fer-bore cylindrique de diamètre 6 cm et d'épaisseur 5 mm. Le champ en son centre a une intensité de 93 mT mais varie entre 82 et 110 mT dans un volume de 2 cm^3 . Le montage initial est schématisé Fig.4.6 A. Les bouchages de puce n'étaient pas rares et toutes les cellules n'étaient pas récupérées en sortie du canal (comme nous avons pu nous en apercevoir en comptant, sur cellule de Malassez, les cellules à l'entrée et à la sortie du canal).

Le passage des cellules seules dans différentes puces de 1 mm de large a été observé grâce à un microscope optique au grossissement 5X couplé à une caméra rapide (100 images/s, Dalsa PT-41-04M60). Les tests réalisés dans cette configuration sont résumés dans le Tableau 4.1.

4.2.2 Aimant et hauteur des canaux

D'autres tests d'écoulements ont été réalisés sur des échantillons contenant 10^5 NS1/mL et 23 μg de billes/mL dans des puces avec des canaux de largeur 100 μm et de hauteurs variées placées sur des aimants différents. Le comptage du nombre de cellules en sortie de l'écoulement et l'observation du réservoir d'entrée de la puce après écoulement ont permis d'évaluer la meilleure configuration. Les tests effectués sont résumés dans le Tableau 4.2. Ces tests ont permis de déterminer les deux causes de bouchage :

- des canaux trop bas,
- un gradient de champ élevé, menant à l'accumulation des objets magnétiques dans une même zone du canal.

Hauteur du canal	Aimant utilisé	Bouchage	Accumulation de cellules dans le réservoir
21 μm	Aucun	Fréquent	Non
24, 34 et 46 μm	Aucun	Rare	Non
24 μm	Aimant initial	Fréquent	Importante
46 μm	Aimant initial	Rare	Importante
24 μm	Aimant homogène	Rare	Faible
46 μm	Aimant homogène	Rare	Faible

Tableau 4.2 – Tests réalisés dans des puces de 100 μm de large avec des échantillons positifs à 10^5 NS1/mL et 23 μg de billes/mL. Le comptage du nombre de cellules en sortie de l'écoulement et l'observation du réservoir d'entrée de la puce permettent de tirer des conclusions pour chaque condition.

4.2.3 Conclusions des expériences préliminaires

Tenant compte des résultats de ces deux études, un réservoir fluidique vertical sans raccord a alors été mis au point dans un matériau peu adhérent, le polyoxyméthylène. La pression imposée a été fixée au maximum des capacités du contrôleur de pression, c'est-à-dire à 300 mbar. Un dispositif (nommé ensuite aimant homogène) contenant deux aimants et deux plaques de μ -métal formant une zone de champ homogène au centre de la structure est utilisé. La mesure avec un Gaussmètre a permis d'évaluer que le champ dans un volume de 2 cm^3 autour du centre de la structure varie entre 88 et 89 mT. L'ensemble de l'échantillon liquide se trouve dans cette zone de champ très homogène. Le dispositif de champ homogène a alors été percé pour permettre l'introduction du réservoir fluidique dans cette zone et son chargement maximum a été défini à 400 μL . Le système final est présenté Fig.4.6 B. Les canaux microfluidiques de 25 μm de haut sont suffisants avec ce nouveau montage pour éviter les bouchages.

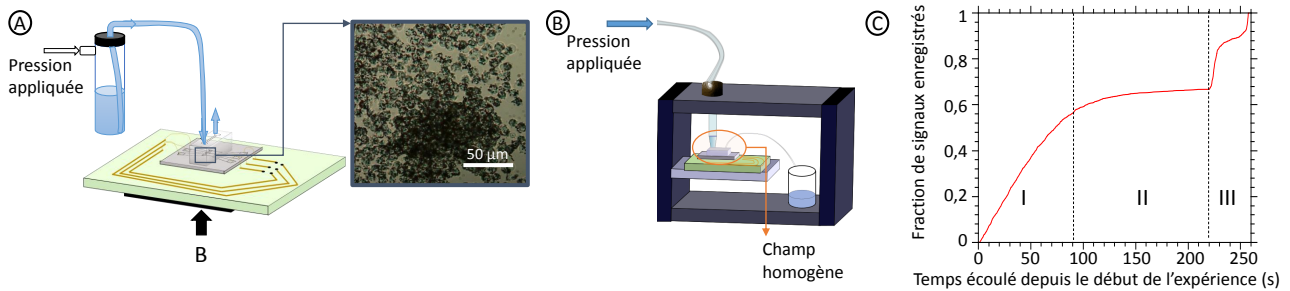


FIGURE 4.6 – Evolution du montage de l'expérience. A) Montage initial avec réservoir Fluigent, aspirant l'échantillon par le haut, et aimant permanent inhomogène placé sous le capteur. Après passage d'un échantillon, certaines cellules restent au fond du réservoir et d'autres sont bloquées dans l'entrée de la puce, zone de ralentissement fluïdique et soumise à un fort gradient magnétique. B) Nouveau montage. Le réservoir a été « fait maison » pour ne présenter aucun raccord ni aucun rebord. Il est de plus incliné, ainsi que la puce microfluidique, dans un montage comprenant 2 aimants et deux plaques en μ -métal créant un champ homogène sur tout un volume en son centre. Le réservoir ne doit pas être rempli à plus de 400 μ L afin d'éviter de sortir de cette zone de champ homogène. C) Avec ce nouveau dispositif, toutes les cellules sont récupérées à la sortie mais leur passage au-dessus du capteur n'est absolument pas régulier dans le temps. Dans un premier temps, le passage d'objets est régulier, ensuite, durant la phase la plus longue, il ne passe quasiment plus aucun objet devant le capteur, enfin, les quelques derniers microlitres emportent une grande quantité de cellules (et/ou de billes).

Quelques expériences de vérification ont été réalisées afin d'évaluer la répercussion du nouveau montage sur le passage des cellules. Un échantillon de 300 μ L à 10^5 cellules NS1/mL et 23 μ g/mL de Dyna1 fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 (Dyna1-anti-CD138) et un échantillon de 300 μ L à 10^5 cellules NS1/mL et 23 μ g/mL de Dyna1 fonctionnalisées par l'anticorps IpaD315 (Dyna1-IpaD315) ont été passés dans le nouveau système (hauteur de canal de 36 μ m) et la concentration en cellules du liquide collecté en sortie a été évaluée par comptage sur cellule de Malassez et trouvée très proche de la concentration initiale (moins de 25% de variation). D'autre part, une deuxième expérience a été réalisée enregistrant les signaux obtenus sur le passage d'un échantillon de 200 μ L à 10^5 cellules NS1/mL et 23 μ g/mL de Dyna1 fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 dans une puce de 26.5 μ m de haut. L'enregistrement des signaux (Fig.4.6 C) a révélé que le passage des objets dans le canal au cours du temps est loin d'être linéaire. Ce phénomène peut être compris ainsi :

- (I) Les cellules passent régulièrement dans le canal, avec une concentration supérieure à la concentration nominale due à la géométrie verticale du réservoir et au phénomène de sédimentation des cellules. Donc, bien avant que le liquide ne soit totalement passé, la concentration en cellules chute jusqu'à être quasiment nulle dans le réservoir d'entrée.
- (II) Très peu de signaux sont comptés jusqu'à la quasi-fin du passage de l'échantillon.
- (III) Aux derniers microlitres de liquide, les cellules qui avaient tapissé l'intérieur du réservoir se font arracher des parois par la tension de surface et, brusquement le nombre de signaux comptés par seconde atteint son maximum.

Ce manque de régularité a de nombreux inconvénients comme la génération de longues plages de temps sans aucun signal attestant du bon déroulement de l'expérience ou le chevauchement des derniers signaux les rendant beaucoup plus difficiles à dénombrer précisément. Cependant, aucun autre système testé n'a permis de passer l'ensemble des cellules d'un échantillon. Des améliorations possibles seront discutées dans les perspectives.

4.2.4 Plan d'expériences

Toutes les conditions sont réunies pour réaliser et tester la puce GMR. Pour l'évaluer en tant qu'outil de diagnostic cependant, un protocole d'expériences soigné doit être mis en place.

Dans un premier temps, plusieurs expériences sont réalisées avec les trois mêmes échantillons, choisis pour évaluer la spécificité du test :

- 10^5 NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- 10^5 NS1 + 23 μg de Dynal-IpaD315 dans 1 mL de PBS (contrôle négatif 1)
- 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS (contrôle négatif 2)

La concentration de 10^5 NS1/mL est justifiée par deux raisons : i) tous les tests de labélisation ont été menés à cette concentration, c'est donc un échantillon bien connu, ii) c'est aussi une concentration assez élevée qui permet à la fois un contrôle visuel très simple de leur labélisation par les billes magnétiques et une différence nette entre les échantillons positifs et négatifs. Les deux contrôles négatifs différents sont également indispensables. En effet, le premier consiste à vérifier que les billes se lient bien aux cellules spécifiquement par l'anticorps anti-CD138 et non à cause d'une liaison non spécifique, indépendante de l'interaction épitope (à la surface de la protéine CD138 cible) / paratope (porté par l'anticorps), liaison qui serait visualisée avec les billes portant l'anticorps IpaD315. Le second contrôle vérifie que les billes utilisées pour l'échantillon positif ne créent pas par elles-mêmes, en absence de cellules, les signaux repérés pour l'échantillon positif. Ainsi par ces trois tests, répétés au moins trois fois, la spécificité peut être attestée si une différence notable est observée entre l'échantillon positif et les deux échantillons négatifs. Si aucune différence n'est observée, alors cela signifie que les signaux observés ne sont pas spécifiques de l'interaction anticorps anti-CD138 / cellules NS1. Les étapes préliminaires sont alors à reprendre.

Une fois cette validation de la spécificité du test réussie, des expériences sont menées pour déterminer une limite de sensibilité du test dans les mêmes conditions. Les échantillons sont préparés avec des dilutions de cellules de 3 en 3 à partir de la concentration initiale (10^5 cellules/mL) jusqu'à une concentration menant à l'échec du test (non détectabilité des cellules labélisées). Les échantillons contrôle doivent également être passés à chaque expérience. Un contrôle négatif supplémentaire peut être ajouté pour vérifier que les billes fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique des cibles ne se lient pas à d'autres lignées cellulaires. Les cellules Ovariennes de Hamster Chinois (CHO pour « Chinese Hamster Ovary cells » en anglais) ont été sélectionnées pour ce rôle car elles ne possèdent pas l'antigène cible CD138, et elles présentent l'avantage d'être très faciles à cultiver. Toutes ces expériences doivent être répétées au moins trois fois pour pouvoir mener à une conclusion. Finalement, selon les expériences nous avons utilisé 8 échantillons :

- 10^5 NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- $3 \cdot 10^4$ NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- 10^4 NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- $3 \cdot 10^3$ NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- 10^3 NS1 + 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS
- 10^5 NS1 + 23 μg de Dynal-IpaD315 dans 1 mL de PBS (contrôle négatif 1)
- 23 μg de Dynal-anti-CD138 dans 1 mL de PBS (contrôle négatif 2)
- 10^5 CHO + 23 μg de Dynal-CD138 dans 1 mL de PBS (contrôle négatif 3)

4.3 Déroulé d'une expérience

4.3.1 Préparation des échantillons

Préparation des cellules NS1

Quelques heures avant une expérience, les suspensions de cellules en culture sont récupérées puis centrifugées (10 min, 1000 RPM avec un rayon de 17.2 mm à 9°C) et reprises dans le milieu souhaité préalablement chauffé à 37°C (les expériences ont principalement été réalisées en PBS et en 20% PBS 80% plasma de lapin). Leur dénombrement est ensuite effectué de trois façons différentes et la concentration est déterminée comme la moyenne de ces trois résultats :

- les cellules sont diluées au centième et dénombrées au compteur de cellules TC20,
- les cellules sont diluées au centième et comptées sur cellule de Malassez,
- les cellules non diluées sont directement comptées sur cellule de Malassez.

Préparation des cellules CHO

Les cellules CHO sont lavées deux fois en PBS. Ensuite, 2 mL de trypsine-EDTA à 0.25% leur sont ajoutées et elles sont remises à 37°C pendant 2 minutes. Après vérification au microscope de leur décollement du fond de la boîte de culture (cellules adhérentes), elles sont diluées dans 7 mL de milieu de culture et centrifugées (5 min, 1500 RPM avec un rayon de 17.2 mm à 4°C). Elles sont ensuite reprises dans le milieu souhaité préalablement chauffé à 37°C et dénombrées au compteur de cellules TC20 après dilution au centième.

Immunocapture des cellules

Pour chaque échantillon prévu, les cellules sont diluées à la concentration voulue dans 1 mL du tampon choisi (PBS, plasma de lapin 100%, 80% plasma de lapin et 20% PBS etc.). Ensuite, 10 µL des échantillons sont prélevés pour une vérification de la concentration en cellules obtenue par comptage en cellule de Malassez. Les billes magnétiques sont vortexées pendant 2 minutes avant que le volume choisi ne soit ajouté à chaque échantillon. Les solutions sont incubées sous rotation douce à 20°C pendant 2 heures (temps optimisé lors d'expériences préliminaires décrites au §2.3.1). 100 µL de chaque échantillon sont ensuite prélevés pour une observation au microscope de la labélisation des cellules et de l'état d'agrégation des billes. Cette vérification permet de repérer tout problème potentiel dû aux échantillons comme la stabilité des billes fonctionnalisées.

4.3.2 Montage expérimental

Le montage est représenté schématiquement par la Fig. 4.7 A.

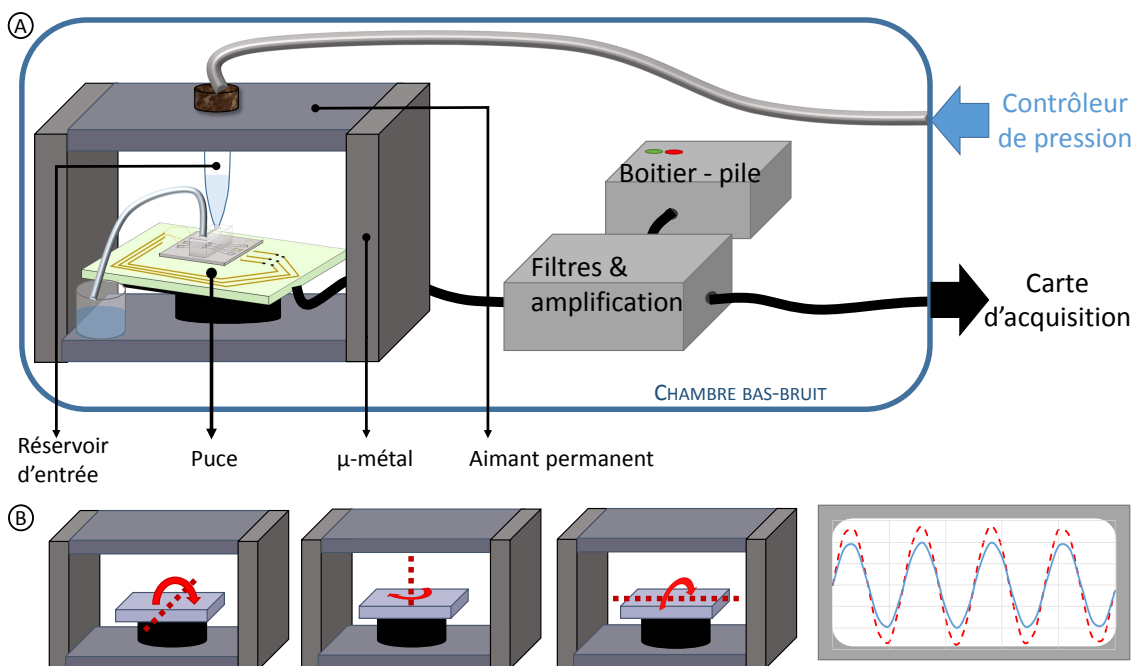


FIGURE 4.7 – Montage expérimental. A) La biopuce et le porte échantillon sont entièrement fixés dans l'entre-fer de l'aimant permanent, maintenus dans une zone de champ constant et relativement homogène. Les capteurs sont alimentés par un courant continu (entre 1 et 2 mA) délivré par une batterie rechargeable. Le signal est filtré et amplifié dans une enceinte blindée magnétiquement avant d'être envoyé vers une carte d'acquisition. Le contrôleur de pression, branché sur secteur, est maintenu hors de l'enceinte blindée. B) Réglage des angles de positionnement du capteur afin de maximiser la sensibilité et minimiser le bruit perçu. Ce réglage est fait alors que le capteur est soumis à un champ alternatif créé par une bobine autour du capteur en s'aidant d'un oscilloscope.

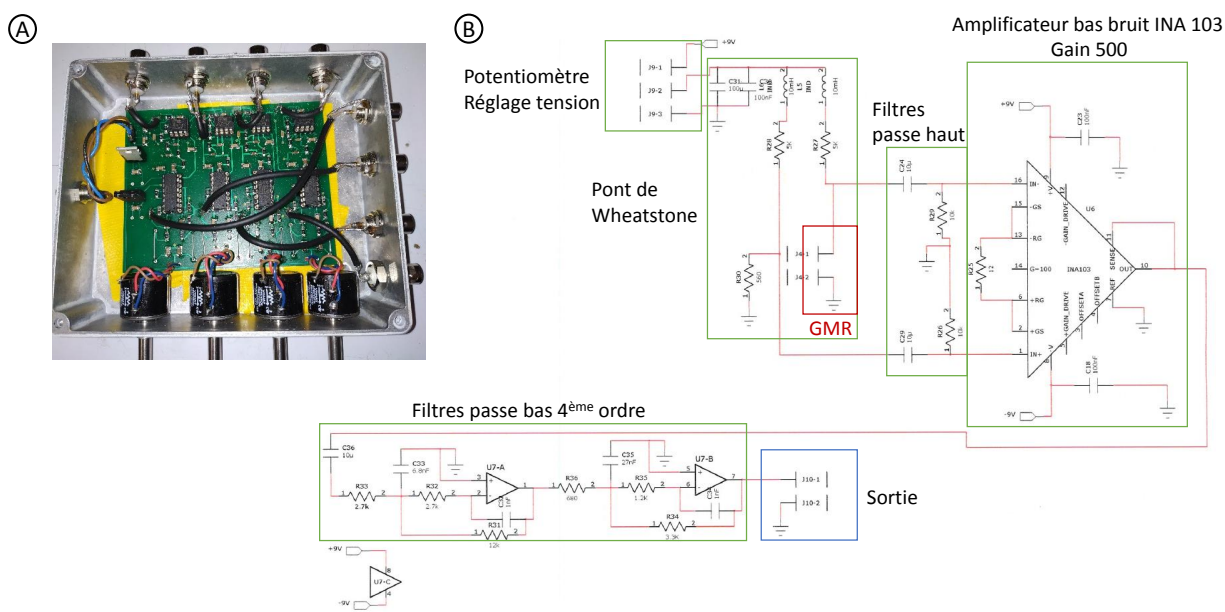


FIGURE 4.8 – A) Photographie du boîtier d'amplification et de filtrage quatre voies. B) Schéma d'une voie de ce boîtier. Les valeurs des composants doivent être adaptées à la résistance du capteur utilisé. Le pont de Wheatstone doit être équilibré et les filtres correspondent aux fréquences de coupures choisies.

Fluidique

Après l'essai de différents pousse-seringues, la solution la plus adaptée au système s'est révélée être un contrôleur de pression. En effet, le moteur des pousse-seringues engendre du bruit perçu par les capteurs. L'appareil MFCSTM-EZ : Microfluidic Flow Control System (Fluigent®) a été retenu. Il permet d'injecter les échantillons de manière très régulière dans le canal microfluidique. Comme il peut être placé loin du laboratoire sur puce (quelques mètres) ni l'alimentation sur secteur, ni la bouteille de gaz sous pression, n'engendrent de bruit supplémentaire sur les signaux. La pression appliquée est choisie par l'utilisateur grâce à un programme informatique sur une plage de 20 à 320 mbar. L'appareil pousse le liquide dans la puce microfluidique par l'action du gaz sous pression.

Electronique

Les deux boîtiers électroniques utilisés ont été réalisés au laboratoire. Le premier boîtier contient une batterie rechargeable permettant de ne pas travailler sur secteur⁴. Le second boîtier⁵, alimenté par le premier, filtre et amplifie les signaux émis par le capteur avant de les envoyer vers la carte d'acquisition. La tension d'alimentation du capteur est réglée à l'aide d'un potentiomètre. Le capteur est intégré à un pont de Wheatstone pré-équilibré par une résistance de valeur à peu près équivalente à celle du capteur GMR. Les deux branches du pont sont filtrées par un filtre passe haut de premier ordre de fréquence de coupure 15 Hz, permettant de s'affranchir de la composante continue que le pont, non parfaitement équilibré, laisse. Les composantes variables des signaux sont ensuite amplifiées 500 fois à bas bruit par un amplificateur opérationnel de type INA 103 (Burr Brown®). A la sortie de l'amplificateur opérationnel, le signal est filtré par un filtre passe bas d'ordre 4 de fréquence de coupure 10 kHz qui a un gain de 20. La Fig. 4.8 présente une photographie et le schéma du boîtier contenant filtres et amplification.

4. Ce boîtier a été conçu par Claude Fermon et réalisé par Nathanaël Brocard.

5. Ce boîtier a été conçu par Claude Fermon et réalisé par Romain Lacoste.

Vérifications et passage des échantillons

Le capteur est monté sur son support puis la mesure de sensibilité est réalisée grâce à une bobine calibrée fixée sur le support de l'aimant. La bobine délivre un champ de $2.8 \cdot 10^{-2}$ mT au niveau du capteur lorsqu'elle est alimentée par un courant de 101 mA. Un décalage de quelques millimètres est possible d'un capteur à l'autre, entraînant une incertitude de l'ordre de $0.2 \cdot 10^{-2}$ mT sur cette valeur. Elle est alimentée en courant alternatif à la fréquence de 100 Hz. Le positionnement précis du capteur dans le champ homogène, pour compenser l'hystérésis du capteur sans trop réduire sa sensibilité, est permis par un montage mécanique de hauteur fixe (au niveau de la zone d'homogénéité) avec vis micrométriques réglant les trois angles du plateau. La puce est vissée sur ce support, lui-même vissé sur la structure de l'aimant permanent. Ainsi, les capteurs sont solidaires de l'aimant permanent et ne vibrent pas (ce qui créerait de forts parasites). Ce réglage s'opère alors que la bobine fonctionne, nous permettant de rechercher le point de sensibilité maximale. Cette sensibilité est alors évaluée en mesurant à l'oscilloscope l'amplitude du signal perçu par le capteur. L'incertitude sur cette valeur peut être calculée selon l'équation (4.1), et de la même façon, il est possible de déduire de l'équation (4.2) l'incertitude de la mesure du champ correspondant à un signal d'amplitude (en volts) donnée. Pour chaque mesure présentée dans le Chapitre 5, ces deux incertitudes ont été évaluées.

$$\Delta S = \frac{100}{H_{bob}GV_0} \left(\Delta V_{bob} + \frac{V_{bob}\Delta H_{bob}}{H_{bob}} + \frac{V_{bob}\Delta V_0}{V_0} \right) \quad (4.1)$$

$$\Delta H_{mesure} = \frac{100}{SGV_0} \left(\Delta V_{mesure} + \frac{V_{mesure}\Delta S}{S} + \frac{V_{mesure}\Delta V_0}{V_0} \right) \quad (4.2)$$

Où :

- G est le gain de la chaîne d'acquisition
- S est la sensibilité du capteur ($\% \cdot \text{mT}^{-1}$)
- ΔS est son incertitude de mesure ($\% \cdot \text{mT}^{-1}$)
- V_0 est la tension appliquée aux bornes du capteur (V)
- ΔV_0 est son incertitude de mesure (V), dépendant de l'incertitude du voltmètre utilisé
- H_{bob} est l'amplitude du champ magnétique généré au niveau du capteur par la bobine (mT)
- ΔH_{bob} est son incertitude de mesure (mT), dépendant du gaussmètre utilisé et du positionnement précis du capteur par rapport à la bobine
- V_{bob} est l'amplitude du signal généré par la bobine en bout de chaîne d'acquisition (V)
- ΔV_{bob} est son incertitude de mesure (V), égale au niveau de bruit
- H_{mesure} est l'amplitude du champ magnétique mesuré par le capteur pour un signal donné (mT)
- ΔH_{mesure} est son incertitude de mesure (mT)
- V_{mesure} est l'amplitude d'un signal mesuré donné (V)
- ΔV_{mesure} est son incertitude de mesure (V), égale au niveau de bruit

Le courant dans la bobine est alors coupé, et le bruit perçu par le capteur est mesuré comme étant le signal pic à pic résiduel. Le réservoir fluide est introduit dans l'entrée de la puce et de l'eau est passée. Durant ce passage préliminaire, le niveau de bruit enregistré par le capteur est surveillé, aucune variation ne doit être observée.

Les expériences sont ensuite effectuées dans un ordre aléatoire. Tous les échantillons passés font le même volume et, entre les passages de deux échantillons, un même volume d'eau déionisée rince la puce.

Acquisition des données

L'acquisition des données se fait grâce à une carte d'acquisition (Data Translation) interfacée par un programme réalisé en Pascal (sous Lazarus). Ce programme acquiert les données par paquets de 6000 sous forme de caractères puis les enregistre sur un fichier. Il est capable d'enregistrer les données à des fréquences dépass-

sant le MHz sur plusieurs voies. Dans ce projet, la fréquence d'acquisition a été fixée à 200 kHz et le nombre de voies n'a jamais dépassé 2. Les fichiers enregistrés contiennent une seule colonne. La première ligne contient la fréquence d'enregistrement, la seconde, le nombre de voies enregistrées et toutes les suivantes sont les points expérimentaux dans l'ordre d'enregistrement.

4.4 Tests de comparaison

Les résultats que nous avons obtenus avec les capteurs GMR sur le modèle des cellules NS1 ont été comparés à ceux obtenus avec des techniques réalisées en routine dans les laboratoires comme le test bandelettes, test terrain par excellence, ou le test ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »), bien adapté à notre problématique. Pour une comparaison avec une technique en flux et particulièrement adaptée aux études des cellules uniques, la cytométrie en flux a aussi été utilisée.

4.4.1 Tests immunochromatographiques, dits tests bandelette

Le principe du test est présenté par la Fig. 4.9. Deux types de bandelettes commerciales répondant le mieux à nos critères de migration de gros objets ont été testés : les bandelettes PRIMA 40 (de porosité inconnue, mais utilisées en routine au LERI notamment pour la migration de bactéries) et les bandelettes MDI 15 μm , porosité permettant en théorie le passage de cellules.

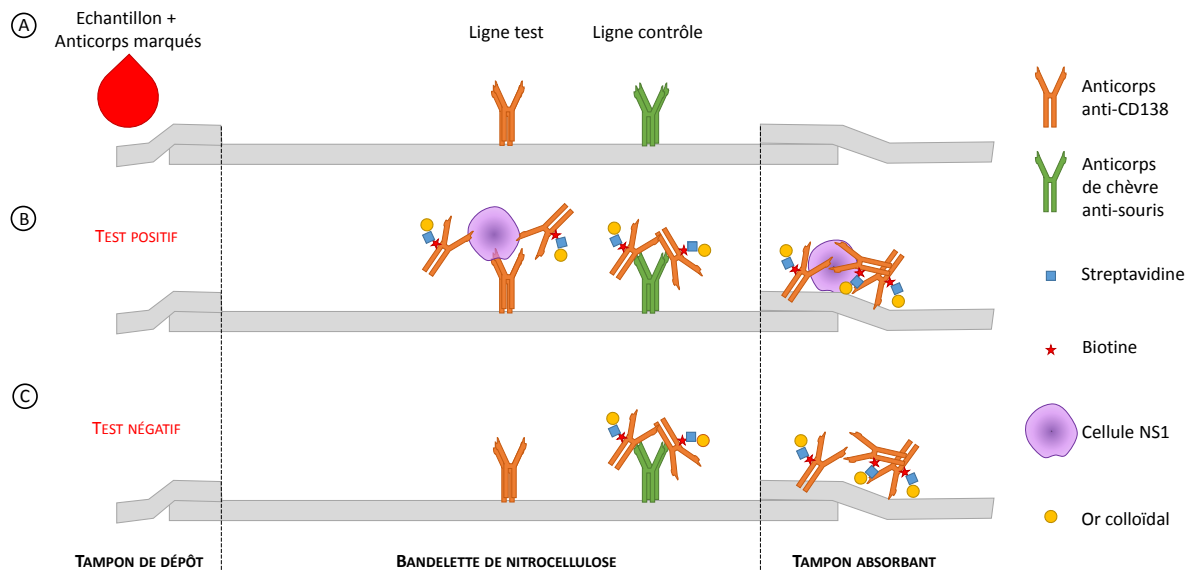


FIGURE 4.9 – Principe du test bandelette. A) Principe du test et présentation de la bandelette. B) Test positif : les bandes test et contrôle apparaissent. C) Test négatif : seule la bande contrôle apparaît.

Préparation des bandelettes Les anticorps de la bande dite « test » (anti-CD138) et de la bande dite « contrôle » (anticorps de chèvre anti-souris, appelé CAS) sont déposés sur la membrane de nitrocellulose à l'aide d'un dispenseur de contact au microlitre (BioDot) à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les membranes sont ensuite séchées 1 heure à 40°C en étuve, puis saturées 30 minutes dans une solution de PBS additionnée de 0.5% de BSA sous agitation. Les membranes sont lavées trois fois en eau milli-Q® et laissées en PBS additionné de 7.5% de glucose et de 0.1% de tween 20 pendant 15 minutes. Les membranes sont finalement séchées 30 minutes à 40°C dans une étuve. Les papiers absorbants du bas de la bandelette (AccuFlowG, Whatman Schleider & Schvell Bioscience) et du haut de la bandelette (470, Whatman Schleider & Schvell Bioscience) sont collés. Les bandelettes, de 5 mm

de largeur, sont découpées à la guillotine (CM5000, BioDot) et sont stockées à température ambiante jusqu'à utilisation.

Préparation des traceurs Les anticorps conjugués (dits « traceurs ») utilisés pour ces tests et permettant la révélation de la présence de la cible sont des anticorps couplés de façon non covalente à des particules d'or colloïdal. Ces suspensions sont régulièrement préparées au LERI. 25 µg d'anticorps anti-CD138 sont repris dans 150 µL de tampon borax 20 mM pH 10.0 et ajoutés à 1 mL d'or colloïdal préalablement préparé. Le mélange est incubé 1 heure à 20°C sous agitation. La suspension est ensuite saturée par l'ajout de 100 µL de tampon borax 20 mM pH 10.0 additionné de 1% de BSA. L'or colloïdal auquel est adsorbé l'anticorps est ensuite lavé 2 fois dans la solution de saturation, étapes séparées par centrifugation de la solution à 15000 g pendant 30 minutes. Le culot est finalement repris dans 250 µL dans cette même solution de saturation. La suspension est stockée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Test Plusieurs tampons ont été essayés pour la réalisation des tests sur les deux types de bandelettes :

- tampon EIA : PBS + 0.1% BSA + 0.01% azide de sodium + 0.5% tween 20
- tampon NBC-sys : tampon Tris HCl 0.1 M pH 8.0 + 0.15 M NaCl + 0.01 M EDTA + 0.01% azide de sodium + 1% CHAPS + 0.5% tween 20
- tampon antibio-résistance : tampon Tris HCl 0.1 M pH 8.0 + 0.15 M NaCl + 0.1% BSA + 0.01% azide de sodium + 1% CHAPS + 0.5% tween 20

Dans chaque condition, une gamme de concentrations en cellules NS1 est préparée (10^6 NS1/mL, 10^5 NS1/mL, 10^4 NS1/mL, 10^3 NS1/mL, 10^2 NS1/mL) et 1 test contrôle est prévu sans cellules. Dans une plaque 96 puits, on dépose 100 µL de chaque suspension de cellules et du test négatif (tampon seul). Pour toutes les suspensions on ajoute 10 µL d'or colloïdal-anti-CD138. La plaque est mise à incuber 5 minutes sous agitation puis une bandelette est déposée dans chaque puits et le liquide migre jusqu'à absorption totale par la bandelette (environ 15 minutes). La photo des bandelettes est alors prise et le test s'achève.

4.4.2 Test sandwich ELISA

Le principe du test est résumé sur la Fig. 4.10.

Préparation des plaques Une plaque 96 puits contenant 100 µL par puits d'anticorps anti-CD138 à 10 µg/mL en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7.4 est incubée une nuit à 20°C. Cette étape permet l'adsorption des anticorps sur le plastique de la plaque. Le lendemain elle est vidée et 300 µL de tampon EIA sont ajoutés par puits. Les sites ne possédant pas d'anticorps adsorbés sont saturés par la BSA présente dans le tampon EIA (la composition du tampon EIA a été donnée dans la section test bandelette). La plaque est ensuite scotchée hermétiquement et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

Préparation de l'anticorps biotinylé Voir §4.1.3.

Test Deux matrices ont aussi été utilisées pour ces tests ELISA :

- PBS
- 20% PBS et 80% plasma de lapin naïf

Les dilutions de cellules sont préparées dans le tampon souhaité (3×10^6 NS1/mL, 10^6 NS1/mL, 3×10^5 NS1/mL, 10^5 NS1/mL, 3×10^4 NS1/mL, 10^4 NS1/mL, 3×10^3 NS1/mL, 10^3 NS1/mL). La plaque est lavée une fois en tampon de lavage (phosphate de potassium 50 mM pH 7.4). 100 µL de suspension de cellules à tester sont ajoutés par puits. Les premiers 8 puits sont laissés vides (servant à la mesure de l'absorbance du substrat). Les échantillons sont déposés en duplicats et 8 puits sont testés en tampon seul, sans cellules. Ces tests sans cellules permettent de mesurer le signal non spécifique généré par les différents réactifs du test.

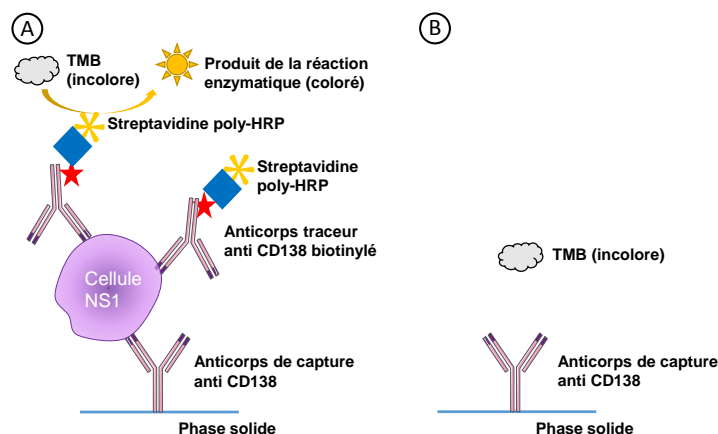


FIGURE 4.10 – Principe du test ELISA sandwich. A) Schéma d'un test positif. B) Schéma d'un test négatif.

Les suspensions sont incubées 2 heures à température ambiante sous agitation. La plaque est lavée 3 fois en tampon de lavage (400 μL par puits). Sont ajoutés 100 μL par puits d'une solution d'anticorps anti-CD138 biotinylé à 100 ng/mL en tampon EIA. Les suspensions sont incubées 2 heures à température ambiante sous agitation. La plaque est lavée 3 fois en tampon de lavage (400 μL par puits). 100 μL d'une solution commerciale de streptavidine couplée à l'enzyme peroxydase du raifort (streptavidine-polyHorseRadishPeroxydase ou « streptavidine-polyHRP », Thermofisher) diluée 1/15000^{ème} en tampon EIA sont ajoutés par puits. Les suspensions sont incubées 30 minutes à température ambiante sous agitation et les liaisons biotine / streptavidine se forment. La plaque est lavée 5 fois en tampon de lavage (400 μL par puits). 100 μL d'une solution commerciale de « TMB » (tétraméthylbenzidine, substrat de l'enzyme, Thermofisher) sont ajoutés par puits. Les suspensions sont incubées 30 minutes à température ambiante sous agitation. Puis la réaction est stoppée avec 100 μL par puits d'une solution d'acide sulfurique à 2 mol.L⁻¹. Les plaques sont lues au spectrophotomètre à deux longueurs d'onde (450 - 620 nm). Le signal obtenu est directement relié à la concentration de cellules NS1 dans l'échantillon testé.

La soustraction du signal obtenu à 620 nm à celui obtenu à 450 nm permet le calcul des limites de détection (Limit of Detection ou « LoD ») et quantification (Limit of Quantification ou « LoQ »). La LoD de ce test est définie comme la concentration la plus faible en cellules dont le signal est supérieur à celui de la moyenne des signaux non-spécifiques plus trois fois leur écart-type, permettant de catégoriser un échantillon comme positif avec une confiance de 99.7%. Cette mesure permet de donner un seuil de détectabilité théorique à partir duquel on peut dire qu'un échantillon est positif, sans pouvoir donner de quantification précise. Il est aussi possible de définir la LoQ du test comme la concentration en cellules la plus faible permettant de quantifier le nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Son signal doit dépasser la moyenne des mesures obtenues pour le tampon seul plus dix fois leur écart-type. Il est à noter que ces mesures sont des mesures théoriques qui donnent une approximation de la sensibilité du test, non validée par des expériences de répétabilité/reproductibilité, nécessaires à la fine détermination pratique de ces limites de détection et quantification.

4.4.3 Cytométrie en flux

Des échantillons de 200 μL en PBS/0.5% BSA ont été préparés à différentes concentrations en cellules NS1 (de 10^5 à 10^3 /mL avec une dilution de 3 en 3)⁶. Ils ont été incubés 2 h à 4°C avec une concentration constante en anticorps anti-CD138 couplé au fluorophore « PE » (Phycoérythrine, BD Biosciences). Après deux lavages en PBS/0.5% BSA suivis chacun d'une centrifugation, les cellules sont finalement resuspendues dans 200 μL de ce même tampon. L'intégralité des 200 μL a été passée en cytométrie en flux (Novocyte flow cytometer, ACEA) pour chaque échantillon. Le niveau de fluorescence de chaque population pertinente a été évalué et

6. Ces tests ont été effectués par Anne Wijkhuisen.

comparé à celle de l'échantillon contrôle contenant 10^6 cellules/mL incubées dans du tampon sans anticorps fluorescent grâce à l'utilisation du logiciel de traitement de données NovoExpress.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, les différentes étapes de mises en place des expériences sur le capteur un étage ont été détaillées. La fabrication des puces, les dimensions du canal microfluidique et le matériel utilisé ont été décrits et justifiés. Les conditions précises des trois tests standards utilisés pour comparer les performances de notre outil de diagnostic à des systèmes pertinents ont également été exposées.

Chapitre 5

Résultats et discussion

La biopuce GMR a été développée pour effectuer des tests de diagnostic, un certain nombre de critères tels que la spécificité, la rapidité, la robustesse et la reproductibilité/répétabilité, doivent donc être évalués. Dans une première partie, sont présentées les données expérimentales obtenues avec la biopuce ainsi que la manière dont elles ont été traitées. Dans une seconde partie, les performances du test de diagnostic avec la biopuce GMR sont caractérisées et dans une troisième partie, elles sont comparées à celles des tests de diagnostic classiques (bandelette, ELISA et cytométrie de flux) effectués sur le même modèle biologique.

5.1 Traitement des données

Chacun des paramètres numériques utilisés dans ce chapitre a été déterminé par essai/erreur à partir de plusieurs expériences différentes, en visualisant des milliers de vrais signaux issus du passage d'un objet magnétique et de faux signaux issus du bruit. Ces valeurs ont été déterminées pour des expériences enregistrées à une fréquence d'acquisition de 200 kHz. Afin de choisir les paramètres les plus adaptés à l'ensemble des situations probables, les fichiers tests ont été choisis aussi bien dans des expériences à fort niveau de bruit (60 μV pic à pic) que dans des expériences à faible niveau de bruit (8 μV pic à pic). En effet, le niveau de bruit dépend de nombreux paramètres et varie grandement d'une expérience à une autre selon les facteurs présentés §1.2.4 et dont certains sont non maîtrisés (température, vieillissement de la couche de passivation, perturbation extérieure etc.).

Le programme de traitement de données conçu est constitué de trois parties. Il permet :

- de repérer et trier les pics d'intérêt parmi les données enregistrées par un premier programme Lazarus.
- d'analyser ces signaux avec un programme Fortran qui extrait des informations telles que le nombre d'évènements, leurs dimensions et leur symétrie.
- d'ajuster les pics expérimentaux par une équation aux paramètres physiques.

Ces trois parties sont détaillées dans la suite de cette section.

5.1.1 Repérage initial des pics

Une brève description est donnée ci-dessous.

L'utilisateur fixe une valeur seuil d'intérêt V_{lim} et un sens des signaux k_{sens} pour chaque voie d'acquisition, donc pour chaque capteur utilisé ($k_{sens} = -1$ si les signaux sont négatifs puis positifs comme dans la Fig. 5.1, sinon $k_{sens} = 1$). Ces deux paramètres sont fixés manuellement pour chaque expérience en fonction des observations faites à l'oscilloscope. En effet, le sens des signaux dépend de l'orientation magnétique de la couche dure par rapport au sens de circulation des objets magnétiques et nous n'avons pas monté les capteurs dans un sens préférentiel au cours de ces expériences. Ceci pourrait cependant faire l'objet d'un standard. La valeur seuil est réglée au seuil de détection défini au §1.2.4.

Le programme analyse l'ensemble des données et repère les points dépassant ce seuil choisi. Pour chacun de ces points, les minima et maxima locaux sont déterminés en augmentant progressivement l'intervalle d'intérêt

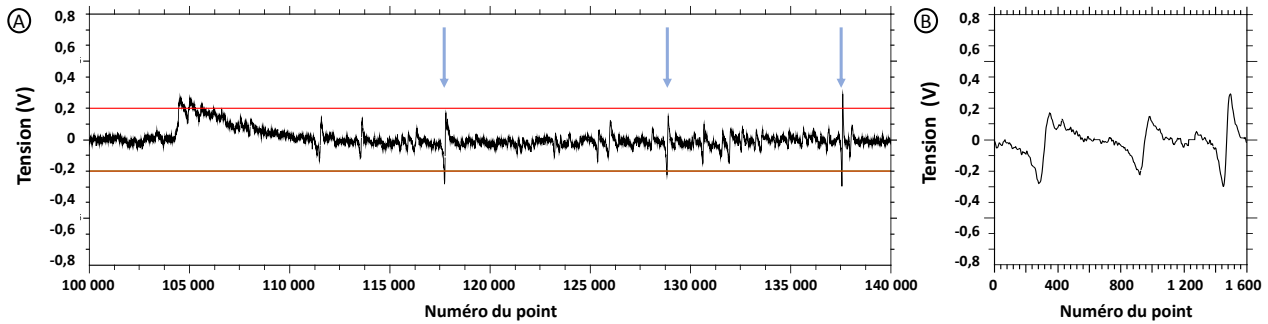


FIGURE 5.1 – Acquisition et tri initial des données par le programme Lazarus. A) Données brutes enregistrées. Les deux lignes rouges marquent la limite de détection fixée ($\pm V_{lim}$) B) Enregistrement de sortie du programme Lazarus. Les signaux sélectionnés par le programme sont signalés sur l’enregistrement brut par des flèches bleues.

de 15 points en 15 points jusqu’à ce que le maximum (i_{max}, V_{max}) et le minimum (i_{min}, V_{min}) déterminés se trouvent à plus de 20 points de chaque bord de l’intervalle.

Plusieurs vérifications sont ensuite effectuées pour valider l’enregistrement de ce pic dans le fichier traité.

- Le signal doit être différent des deux signaux enregistrés précédemment (i_{max} et i_{min} des nouveaux et anciens signaux sont comparés).
- Le signal doit être dans le sens des vrais signaux ($(i_{min} - i_{max})k_{sens} > 0$).
- Le signal doit avoir une largeur cohérente ($3 < |i_{min} - i_{max}| < 500$).
- Le signal doit avoir une dissymétrie faible ($|(V_{max} - V_{min})/(V_{max} + V_{min})| < 0.4$).
- Enfin, les extrema du signal doivent dépasser significativement le niveau de bruit local V_{bruit} calculé sur l’intervalle considéré ($V_{max} - |V_{bruit}| > 1/3V_{lim}$ et $|V_{min}| - |V_{bruit}| > 1/3V_{lim}$).

Ces critères ont été définis pendant l’expérience grâce à l’observation des signaux obtenus dont on connaît la forme grâce aux simulations présentées au Chapitre 3. En effet, la largeur des signaux dépend de la taille selon y du capteur (3 ou 4 μm dans nos expériences), la vitesse des objets, la fréquence d’acquisition et de leur hauteur dans le canal (§3.1.1). Or, pour une vitesse moyenne de 8 cm/s et une fréquence d’acquisition de 200 kHz, les objets se déplacent en moyenne de 10 μm au cours de 25 acquisitions, et la largeur d’un signal correspond à un déplacement de 4 à 100 μm d’un objet, donc de 10 à 250 points en théorie. La dissymétrie provient des angles θ et ψ que le moment magnétique de l’objet aimanté détecté fait avec les axes z (colinéaire au champ magnétique permanent imposé) et x (direction de la largeur du canal) respectivement (§3.1.1). Or, en fixant la valeur de θ à θ_0 , (hypothèse rationnelle puisque les Dynal (billes magnétiques de 1 micromètre de diamètre) contiennent plusieurs milliers de nanoparticules dont le moment moyen est orienté selon l’angle θ_0), aucune valeur de ψ ne donne de rapport de dissymétrie supérieur à 0.4. Les autres tests suppriment de nombreux « vrais » signaux, qui sont d’une amplitude trop faible pour pouvoir être distingués du bruit. Il peut par exemple s’agir de petits agrégats de billes ou de cellules faiblement marquées ou passant trop haut dans le canal.

Un exemple de résultat de tri est montré Fig.5.1. Le premier signal repéré par le programme est dû à une vibration du capteur et non à un évènement réel. Le tri permet de l’éliminer car la symétrie observée ne correspond pas la forme attendue.

5.1.2 Améliorations du tri et extraction des données

Malgré le tri effectué par le programme Lazarus, des erreurs sont encore commises. En effet, d’une part, le bruit dû au RTN (dont la définition est donnée au §1.2.4) génère des faux signaux, sélectionnés au moment du tri et qui sont parfois difficiles à différencier des vrais signaux et d’autre part, les signaux multi-pics de la fin des échantillons (voir §4.2.3) peuvent être mal comptés par ce premier programme car ils sont la manifestation de la superposition d’un grand nombre de signaux.

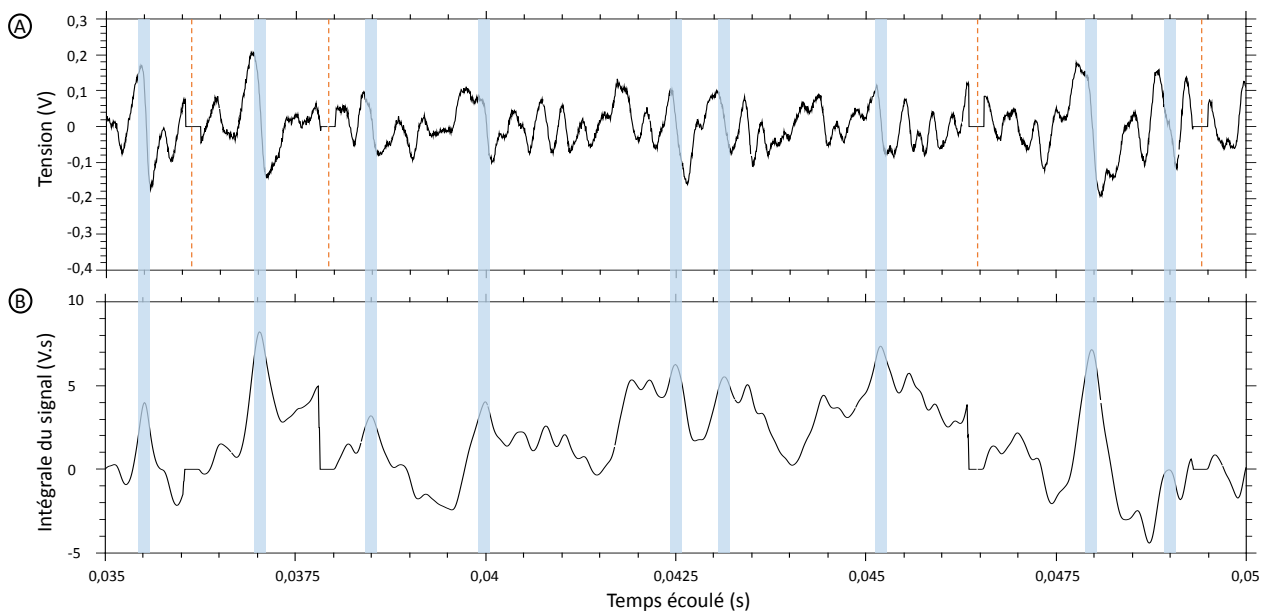


FIGURE 5.2 – Tri secondaire des signaux. Cet exemple est issu de la fin d’écoulement d’un échantillon. A) Enregistrement de sortie du programme Lazarus. Les pointillés orange séparent les 5 signaux repérés. B) Intégrale de l’enregistrement. Les zones surlignées en bleu représentent les 9 signaux comptés par cette seconde étape.

Un programme Fortran est donc utilisé pour améliorer le comptage à partir des fichiers extraits du premier programme. Il lisse les enregistrements sur 4 points (valeur arbitraire), intègre numériquement la courbe et la lisse à nouveau sur 4 points. Sur cette courbe intégrée, le programme cherche les maxima locaux dépassant une valeur limite optimisée en fonction du seuil appliqué à l’expérience. Les pics repérés sont à nouveau triés en fonction de leur largeur devant dépasser 15 points, valeur numérique établie après l’observation de milliers de vrais et faux signaux. Le comptage est effectué sur cette étape, comme présenté dans la Fig. 5.2. Les amplitudes, largeurs et symétries des signaux sont alors à nouveau mesurées.

Cette nouvelle étape dans le programme améliore la précision du nombre de signaux détectés car elle permet de séparer plus efficacement les signaux qui sont très proches les uns des autres. Par conséquent, les paramètres, comme l’amplitude, la largeur et la symétrie, extraits de ces signaux sont également déterminés avec une meilleure précision.

5.1.3 Ajustements

Un programme d’ajustement des données a également été mis au point¹. Il a besoin de 5 données :

- le moment d’une bille $\vec{\mu}$ (norme en emu et angle moyen avec la verticale en degrés),
- les dimensions du capteur (en nm),
- sa sensibilité (en $\%/mT^{-1}$),
- sa tension d’alimentation (en V),
- la fréquence d’acquisition (en Hz).

Il possède 6 paramètres d’ajustement :

- la hauteur de l’objet Z (en nm),
- son nombre de billes magnétiques N ,
- sa vitesse v (en nm/s),
- l’angle ψ du moment magnétique résultant par rapport à l’axe x (en degrés),
- un paramètre de décalage temporel (en s),
- un paramètre de décalage en champ (en nT).

1. Ce programme a été repris et modifié depuis un code Fortran préexistant au laboratoire.

La fonction d'ajustement est la même que celle des simulations dont l'équation (3.2) est donnée au §3.1.1. Elle détermine les caractéristiques d'un objet aimanté créant le champ dipolaire détecté. Cet objet est supposé en translation uniforme dans le canal au-dessus du capteur selon y (direction de la longueur du canal). La courbe d'ajustement est alors obtenue en calculant le champ dipolaire intégré sur la surface du capteur à chaque pas de temps.

Cependant, comme souligné dans l'étude menée au Chapitre 3, certains paramètres ont les mêmes effets sur les signaux : augmenter la hauteur de l'objet revient à diminuer son nombre de billes et diminuer sa vitesse. Ainsi, plusieurs solutions sont possibles et celle proposée par le programme dépend fortement des paramètres initiaux fournis. Avec un seul signal par objet, il est impossible de connaître son nombre de billes et donc la nature de l'objet détecté (agrégat ou cellule marquée).

Une solution pour déterminer ce paramètre est donc d'enregistrer les signaux sur deux capteurs différents, alignés dans le canal. Les signaux des deux voies doivent alors être couplés deux à deux et analysés ensemble. Un programme Fortran a été développé pour cela.

Il compare deux à deux les signaux pertinents des voies 1 et 2. D'abord, le décalage temporel de leur maximum est mesuré. La distance séparant les deux capteurs étant connue avec précision, une vitesse de l'objet peut être déduite. Ensuite, connaissant les sensibilités des deux capteurs, le rapport de l'amplitude en teslas des deux signaux $(\Delta H_{C1})/(\Delta H_{C2})$ est calculé. Le couplage entre les deux signaux est considéré comme juste si la vitesse évaluée est du bon ordre de grandeur (quelques centimètres par seconde, comme évalué par le calcul présenté au §3.2.2) et que le rapport des amplitudes est compris entre 0.7 et 1.3 (30% d'erreur accepté). Ces valeurs ont été estimées grâce à une observation d'une centaine de signaux repérés sur deux voies.

Si un couplage est établi, le programme passe au deuxième signal de l'enregistrement 1 et le signal de la voie 2 couplé au premier ne sera plus comparé aux signaux suivants. Si le couplage n'est pas établi, le programme essaie de coupler le signal de la voie 1 avec le signal de la voie 2 suivant si celui-ci a un décalage temporel avec le signal de la voie 1 pertinent (suffisamment proches dans le temps et non précédemment couplé). Si le couplage du signal de la voie 1 échoue, le programme essaie de coupler le signal de la voie 1 suivant et les signaux pertinents de la voie 2 lui sont à nouveau comparés. Une fois ce couplage effectué, une procédure d'ajustement réalisée en deux temps, permet d'obtenir une proposition unique de modélisation de l'objet détecté et une estimation de sa fiabilité.

- La vitesse v de l'objet est calculée.
- Un ajustement de chacune des deux courbes peut alors avoir lieu en fixant le paramètre v connu.

On obtient alors une estimation du nombre de billes que contient l'objet et de sa hauteur à partir des deux ajustements des signaux enregistrés par chacun des capteurs. La comparaison de ces paramètres obtenus sur les deux voies permet d'avoir une idée de la nature de l'objet mais également d'estimer les barres d'erreurs pour les paramètres déterminés avec cette méthode.

5.2 Résultats pour les puces un étage

Dans cette section sont présentés l'ensemble des résultats des expériences réalisées avec les puces un étage. Ces résultats ont été analysés avec le programme décrit dans la section précédente.

5.2.1 Résumé des expériences en PBS

Au cours de ma thèse j'ai réalisé 54 expériences en tampon simple PBS. 28 d'entre elles ont été effectuées avant l'ensemble des optimisations présentées dans les Chapitres 2, 3 et 4. Les problèmes rencontrés au cours de ces expériences ainsi que les questions soulevées, ont été une étape nécessaire à l'amélioration du dispositif et à l'avancée du projet. Par exemple, le faible nombre de signaux comptés au cours des premiers tests étaient dus à l'agglutination des objets magnétiques dans les réservoirs du canal sous l'effet des gradients du champ permanent appliqué collé sous le dispositif (voir §4.2.2). Par ailleurs, nous avons également montré qu'en plaçant les capteurs directement sous le canal microfluidique, il était difficile de discriminer les différents objets

magnétiques (billes seules, agrégats, cellules marquées) réduisant ainsi fortement la sensibilité du test. Cela a motivé l'étude théorique décrite au §3.2.2 ainsi que l'étude expérimentale décrite aux §2.3.1 et 2.3.2 consistant à la recherche des billes les plus adaptées et à l'adaptation du dispositif aux objets effectivement présents dans nos solutions.

L'ensemble des difficultés rencontrées au cours de ces expériences a permis d'établir un certain nombre de critères nécessaires au bon déroulement d'un test de diagnostic avec cette puce un étage.

Les contrôles définis ci-dessous sont nécessaires à l'obtention de résultats pertinents et fiables :

- le bon déroulement de l'étape de marquage des cellules (dépendant de la température, de l'état physiologique des cellules, de l'ancienneté (et donc stabilité) des billes fonctionnalisées et de l'agitation),
- la stabilité du niveau de bruit et de sensibilité du capteur au cours de l'expérience (dépendant de la température, des boîtiers électroniques, de la qualité de la passivation des capteurs, de la stabilité des capteurs dans le temps, etc.),
- le passage d'au moins un échantillon positif et un échantillon négatif (ce qui suppose que les mêmes conditions expérimentales se maintiennent suffisamment longtemps pour cela).

L'ajout de deux critères supplémentaires valide la comparabilité des résultats entre eux et rend possible l'évaluation de la variabilité des expériences :

- les canaux microfluidiques utilisés dans les expériences doivent être similaires (l'épaisseur de la couche de séparation et la hauteur des canaux microfluidiques sont égaux avec une tolérance d'écart de 10%)
- le même volume de chaque échantillon est passé au sein d'une même expérience et les échantillons injectés dans le réservoir d'entrée passent en intégralité dans la puce. En effet, comme le nombre de signaux en fonction du temps n'est pas linéaire (§4.2.3), tout bouchage, même en fin de tube, biaise fortement les résultats.

Finalement, une série de 7 expériences valide ces 5 critères et permet d'évaluer les performances du test développé. Les détails expérimentaux pour ces 7 expériences sont donnés dans le Tableau 5.1 qui résume l'ensemble des conditions des expériences réalisées avec le capteur un étage. Les résultats obtenus lors de ces expériences ont été publiés (voir Annexe N).

Pour chacune des 7 expériences permettant l'estimation des performances de l'outil de diagnostic, le seuil de détection est différent, variant entre 460 nT et 2.2 μ T. Comme nous l'avons vu au §1.2.4, ce seuil dépend de la sensibilité du capteur et du niveau de bruit de la chaîne d'acquisition. Il a beaucoup varié notamment à cause du changement des boîtiers électroniques, du positionnement précis du capteur dans le champ permanent, du bruit ambiant etc. Pour comparer les résultats entre eux, seuls les signaux dépassant le seuil le plus haut (2.2 μ T) sont comptés. En plus de faciliter les comparaisons entre expériences, un tel seuil diminue le nombre de signaux détectés mais augmente la discrimination entre les signaux spécifiques et non-spécifiques d'après les simulations présentées au §3.2.2 conduisant à des paramètres très proches : 6 μ m de séparation et un seuil de détection autour de 2 μ T.

Ces sept expériences ont été réalisées en suivant le même protocole. Les différents échantillons testés ont été passés séquentiellement et dans un ordre aléatoire avec toujours au moins un échantillon positif et deux échantillons négatifs. Entre deux échantillons la puce a été lavée à l'eau déionisée. Tous les échantillons d'une même expérience ont le même volume et ont été poussés dans le canal avec la même pression.

Nombre de capteurs utilisés	1										2	
	PBS										PL	
Matrice	PBS										MC	PBS
Jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Capteur	Capteur A		Capteur B		Capteur C		Capteur D		Capteur E		Capteur A	Capteur C
e (µm)	6,2	6,4	5,7	5,5	23,1	26,5	29,1	5,5	6,2	5,7	5,5	5,5
h (µm)	26,5	27,4	25,3	23,1	26,5	29,1	5,5	6,2	5,7	5,5	23,1	25,3
Lot de billes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S (%.mT ⁻¹)	1.9	0.89	1.6	3.1	2.5	3.8	2.6	5.7	3.2	2.6	5.7	3.3
ΔS (%.mT ⁻¹)	± 0.24	± 0.03	± 0.07	± 0.72	± 0.53	± 0.56	± 0.2	± 1.1	± 1.1	± 0.2	± 1.1	± 0.8
ΔH _{2,2µT} (µT)	± 1.4	± 1.3	± 2.3	± 1.3	± 1.2	± 0.7	± 0.7	± 1.7	± 1.7	± 0.7	± 1.7	± 1.7
Limite de détection (nT)	1 600	1 800	2 200	470	460	480	430	300	690	430	300	200 et 350
V (µL)	400	200	300	300	300	300	150	300	300	150	300	300
Passé (1) ou non (0)												
Cellules (/mL)	Anticorps											
10 ⁵ NS1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
3 10 ⁴ NS1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
10 ⁴ NS1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
3 10 ³ NS1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
10 ³ NS1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
10 ⁵ NS1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
10 ⁵ CHO	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
∅	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0

Tableau 5.1 – Conditions expérimentales des différentes expériences réalisées. 7 sont des expériences faites en PBS en enregistrant les données d'un seul capteur et ont servi à évaluer les performances du dispositif. Une expérience a été faite en milieu de culture (MC), et une en matrice biologique complexe composée de 20% de PBS et de 80% de plasma de lapin (PL) dans les mêmes conditions. Enfin, une dernière expérience a été faite en PBS en utilisant deux capteurs. L'épaisseur de la couche de séparation (e), la hauteur du canal (h), le lot de billes, la sensibilité S du capteur et son incertitude ΔS, l'incertitude sur la mesure ΔH_{2,2µT} de l'amplitude d'un signal de 2.2 µT, la limite de détection et le volume passé par échantillon (V) sont donnés pour chaque expérience. Les échantillons passés sont aussi indiqués par la concentration et le type de cellules qu'ils contiennent et la fonctionnalisation des billes ajoutées. Tous les échantillons ont été préparés dans des volumes de 1 mL et contiennent 23 µg de Dynal1 fonctionnalisées par un anticorps.

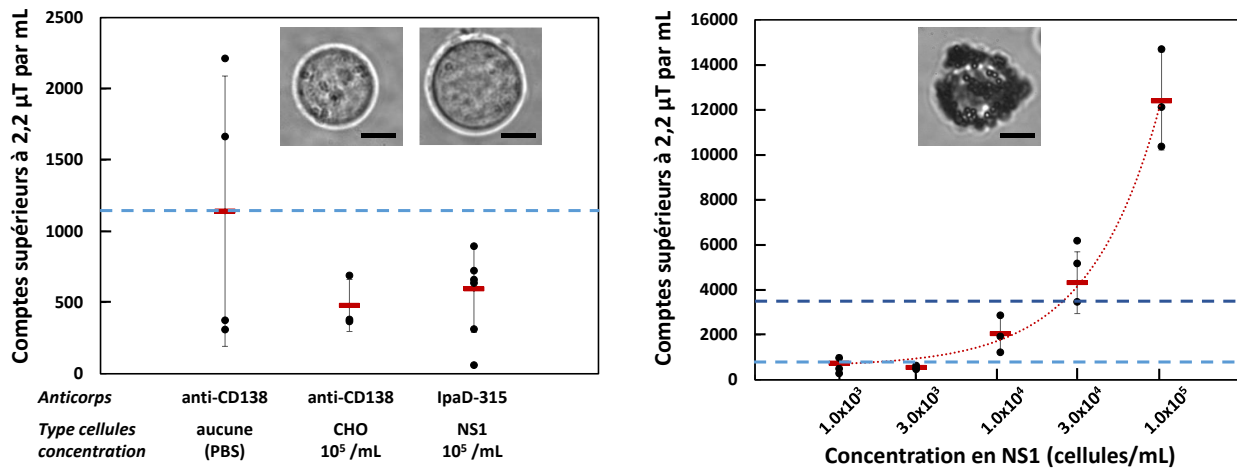


FIGURE 5.3 – Résultats des tests GMR avec puce un étage en PBS. Le nombre de signaux dépassant la valeur seuil de 2.2 μ T en amplitude est donné pour chaque échantillon de 1 mL. La moyenne obtenue pour chaque échantillon est indiquée en rouge, son écart-type est représenté par une barre d'erreur. Les pointillés bleu clair représentent le maximum des moyennes du nombre de signaux enregistrés pour un échantillon négatif. Les pointillés bleu foncé représentent la limite de détection. Les miniatures sont des photographies des échantillons sous un microscope optique à immersion au grossissement 100. La barre d'échelle mesure 5 μ m. A) Résultats des échantillons négatifs. B) Résultats des échantillons positifs.

La Fig. 5.3 présente les résultats obtenus (le nombre de signaux dont l'amplitude est supérieure à 2.2 μ T par millilitre) au cours de chaque expérience, leur moyenne et leur écart-type par échantillon. Pour des raisons d'échelle, les résultats des échantillons négatifs sont présentés séparément.

Nous ne prétendons pas pouvoir déterminer ainsi la répétabilité ou la reproductibilité des résultats. Cependant, nous avons au moins 3 mesures distinctes pour chaque échantillon, nous permettant d'effectuer une première évaluation de la variabilité des résultats, sous la forme de leurs écarts-types, qui est un paramètre primordial lors de l'évaluation des performances d'un test de diagnostic.

Les résultats de l'analyse des échantillons négatifs définissent le seuil de nombre d'évènements détectés par millilitre à partir duquel un échantillon peut être déterminé positif par le test. Par analogie à la limite de détection utilisée pour l'ELISA (voir §4.4.2), ce seuil est défini comme étant la moyenne des mesures obtenues pour l'échantillon négatif plus trois fois son écart-type. Dans nos expériences nous avons utilisé 3 types d'échantillons négatifs différents. Les limites correspondantes ont été calculées pour chacun de ces échantillons et le seuil a été défini comme leur maximum, obtenu pour l'échantillon composé des billes anti-CD138 en PBS soit $3.6 \cdot 10^3$ évènements/mL.

Les résultats des échantillons positifs doivent être comparés à ce seuil. Aux concentrations de 10^5 et $3 \cdot 10^4$ NS1/mL, le test GMR compte plus de $3.6 \cdot 10^3$ évènements/mL : le test mis au point est donc spécifique et a une sensibilité comprise entre 1 et $3 \cdot 10^4$ NS1/mL avec ce modèle.

La sensibilité du test peut être améliorée en augmentant le marquage des cellules. Cependant cette piste dépend de paramètres biologiques et il existera toujours des disparités dans le marquage. Cette disparité peut d'ailleurs être un paramètre intéressant à évaluer [111]. Ainsi, il est plus efficace de diminuer les signaux non spécifiques que de travailler à augmenter les signaux spécifiques.

La définition de la limite de détection montre que deux paramètres jouent sur la sensibilité du test, et peuvent donc être optimisés pour l'améliorer :

- Le nombre moyen de signaux comptés dans les échantillons négatifs.
- L'écart-type du nombre de signaux comptés dans les échantillons négatifs.

Le nombre moyen de signaux des échantillons négatifs dépend de la formation des agrégats et de la distance

de passage des objets par rapport aux capteurs. Pour réduire le seuil de détection, et donc améliorer la sensibilité du test, la diminution de l'agrégation des billes est le moteur principal. Au fur et à mesure des améliorations sur ce point, l'épaisseur de la couche de séparation doit être réévaluée et optimisée selon une étude similaire à celle menée au §3.2.

La variabilité des mesures augmente aussi fortement ce seuil de détection. Un meilleur contrôle des paramètres du système permettrait de réduire les écarts expérimentaux et donc, vraisemblablement, de réduire la limite de détection du test. Différentes actions sont à envisager. Respecter un temps précis entre la préparation des échantillons et leur passage dans la puce pourrait réduire significativement les écarts entre les différentes expériences. Un autre paramètre qui a involontairement varié (de l'ordre de 10%) entre les expériences a été la géométrie des puces. Enfin, soulignons que les conversions entre données expérimentales brutes, en volts, et les données traitées, en teslas se font grâce aux sensibilités des capteurs, dont la détermination entraîne une incertitude non négligeable, calculée au §4.3.2 et reportées dans le Tableau 5.1. L'utilisation d'une référence intégrée aux capteurs permettrait de résoudre ce problème et améliorerait certainement les comparaisons entre deux expériences.

5.2.2 Autres milieux

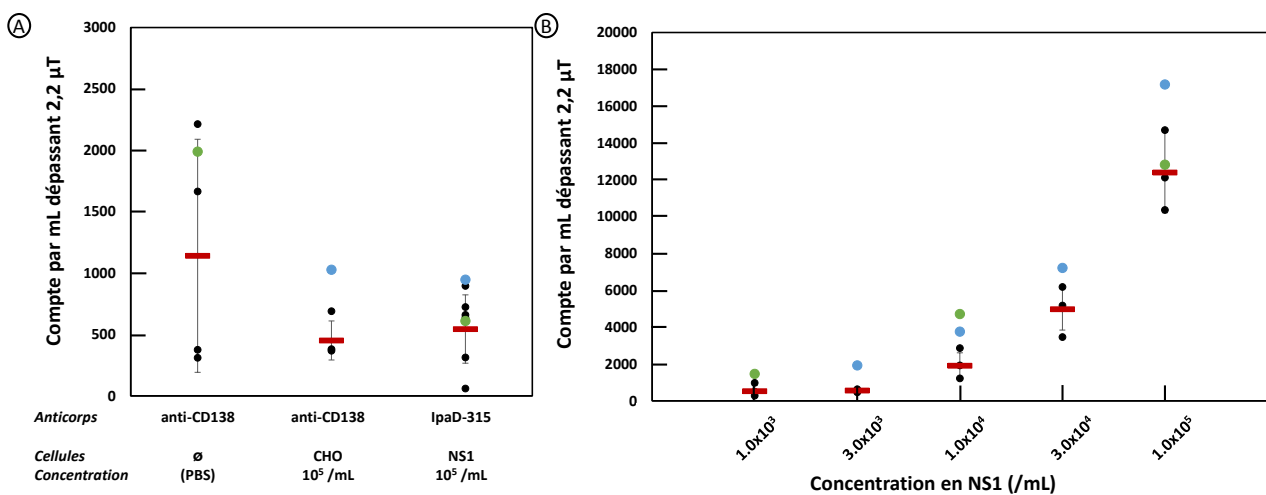


FIGURE 5.4 – Résultats comparés du test GMR avec une puce un étage utilisé pour des tests en 3 matrices différentes. Les points noirs représentent les résultats individuels des tests en PBS, les points verts sont les résultats obtenus en milieu de culture et les points bleus représentent les résultats obtenus avec 20% de PBS et 80% de plasma de lapin. Les barres rouges sont la moyenne des échantillons en PBS et leur variabilité, calculée comme l'écart-type des mesures en PBS, est indiquée en noir. A) Résultats pour les contrôles négatifs. B) Résultats pour les échantillons positifs.

Par manque de temps, seulement deux expériences ont été réalisées dans d'autres milieux. Une expérience a été effectuée en milieu de culture et une autre en matrice biologique complexe constituée de 20% de PBS et de 80% de plasma de lapin. Afin d'être vraiment significatives, ces expériences devront être répétées. Elles peuvent néanmoins être comparées aux résultats obtenus en PBS, puisque seule la matrice est différente, voir Tableau 5.1.

La Fig. 5.4 représente la superposition de toutes les mesures effectuées avec un seul capteur et montre qu'*a priori* la matrice a peu d'influence sur les performances du test, pourvu que cette matrice convienne au marquage des objets, comme testé au §2.3.5.

5.2.3 Utilisation de deux capteurs

Une expérience a pu être réalisée avec deux capteurs côte à côte. Elle a nécessité un doublement des boîtiers électroniques ainsi qu'un changement dans le programme d'acquisition. Afin de disposer d'éléments fiables de comparaison avec les résultats précédents, elle a été réalisée en PBS et a permis de tester les programmes de corrélation et d'ajustement décrits au §5.1.3. Les conditions de réalisation de cette expérience sont données dans le Tableau 5.1.

Le seuil de détection des deux capteurs utilisés dans ces expériences a été très bas. Contrairement aux expériences faites avec un seul capteur, nous avons tout intérêt ici à avoir le seuil de détection le plus bas possible. En effet, dans le cas du capteur unique, le seuil devait être artificiellement augmenté pour mieux discriminer les signaux spécifiques des signaux non-spécifiques. Dans le cas de l'enregistrement du même évènement par deux capteurs en revanche, la discrimination des signaux se fait, non pas sur leur amplitude individuelle, mais sur les propriétés physiques déduites par ajustement corrélé des deux signaux. Ainsi, nous avons tout intérêt à repérer un maximum d'évènements sur les deux capteurs. Les signaux non spécifiques seront éliminés après analyse et nous maximiserons ainsi le nombre de cellules marquées comptées.

Les dix premiers signaux enregistrés sur chaque voie lors de l'écoulement d'un échantillon positif à 10^5 NS1/mL, sont présentés sur la Fig. 5.5. Quatre couples de signaux ont pu être identifiés et ajustés.

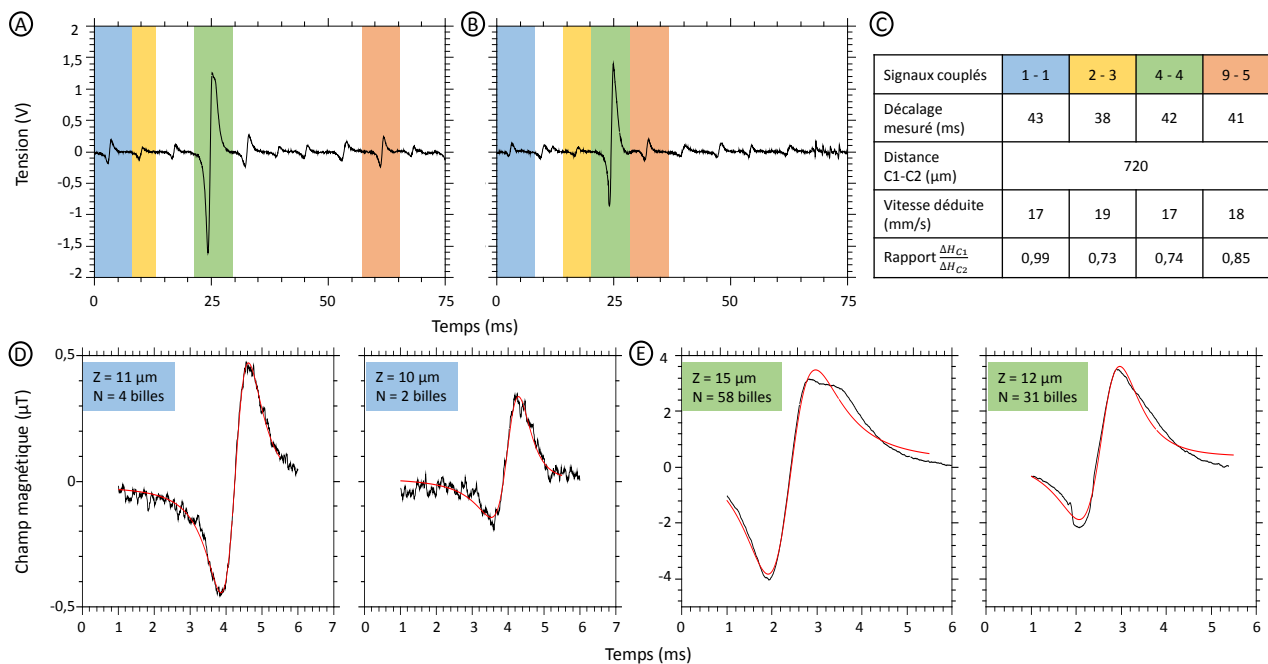


FIGURE 5.5 – Résultat des expériences réalisées avec deux capteurs côte à côte dans le dispositif un étage. A) Premiers signaux enregistrés par le capteur 1. B) Premiers signaux enregistrés sur le capteur 2. C) Couplages de ces signaux : seuls 4 couples sont formés sur les 10 premiers signaux enregistrés par le capteur 1. Ils sont nommés $i-j$ où i est le numéro du signal pour le premier capteur et j est le numéro du signal pour le deuxième capteur. Les couples formés sont indiqués sur les figures A et B par un code couleur. D) Exemple d'ajustements sur le couple 1-1 (bleu). Les données expérimentales converties en teslas sont tracées en noir, la courbe d'ajustement est tracée en rouge. Les paramètres physiques déduits de l'ajustement sont indiqués pour chaque courbe et donnent un accord correct : le signal provient très probablement d'un petit agrégat. E) Exemple d'ajustements sur le couple 4-4 (vert). Les données expérimentales converties en teslas sont tracées en noir, la courbe d'ajustement est tracée en rouge. Les paramètres physiques déduits de l'ajustement sont indiqués pour chaque courbe et donnent un accord très moyen. L'erreur sur ces signaux est grande car ils sont déformés. Les résultats tendent cependant à montrer que l'objet a une charge magnétique importante (certainement répartie de façon très inhomogène) et est donc probablement une cellule marquée.

Parmi ces couples de signaux, deux sont explicités plus en détails. Le premier est issu d'un objet ayant probablement un faible nombre de billes et le second d'un objet ayant probablement un grand nombre de billes. Les signaux provenant d'un objet à faible nombre de billes sont mieux ajustés, leur forme est plus standard (car il provient bien d'un objet unique et peu étendu, conformément à ce que suppose l'équation d'ajustement), et donc les ajustements des deux signaux donnent des propriétés physiques cohérentes. Ces signaux proviennent d'un petit agrégat ou d'une cellule très faiblement marquée circulant à quelques micromètres du fond du canal. Les signaux provenant d'objets marqués plus fortement sont moins bien ajustés. En effet, l'équation d'ajustement suppose la détection d'un seul objet homogène afin de limiter le nombre de paramètres d'ajustement. Or, cette hypothèse n'est pas respectée dans le cas d'une cellule pour laquelle la répartition des billes à la surface peut être très dissymétrique, et entraîner de fait une déformation du signal (voir §3.1.3). Ainsi, les paramètres trouvés pour chaque voie ne coïncident pas très bien. En plus des incertitudes liées à l'équation d'ajustement simplifiée, rappelons que la sensibilité de chacun des capteurs est connue avec une imprécision non négligeable, données dans le Tableau 5.1, ce qui a un fort impact sur la cohérence des résultats entre les deux ajustements. Cependant, comme le deuxième objet est vraisemblablement composé d'un nombre de billes assez élevé et passe dans la zone centrale du canal, on peut penser qu'il s'agit d'une cellule.

Il est même possible d'estimer la probabilité que chacun de ces objets soit une cellule ($P_{N_{billes}}(Cell)$) en supposant que la probabilité *a priori* qu'un signal provienne d'une cellule est la probabilité qu'un objet pris au hasard dans la solution soit une cellule selon la formule d'équation (5.1).

$$\begin{aligned} P_{N_{billes}}(Cell) &= \frac{P(Cell \cap N_{billes})}{P(N_{billes})} \\ &= \frac{P_{Cell}(N_{billes}) \cdot P(Cell)}{P_{Cell}(N_{billes}) \cdot P(Cell) + P_{Agreg}(N_{billes}) \cdot P(Agreg)} \end{aligned} \quad (5.1)$$

Dans cette formule :

- $P_{Cell}(N_{billes})$ est la probabilité que l'objet ait N billes ou plus sachant que c'est une cellule
- $P_{Agreg}(N_{billes})$ est la probabilité que l'objet ait N billes ou plus sachant que c'est un agrégat
- $P(N_{billes})$ est la probabilité *a priori* que l'objet ait N billes ou plus
- $P(Cell)$ est la probabilité *a priori* que l'objet soit une cellule
- $P(Agreg)$ est la probabilité *a priori* que l'objet soit un agrégat

Si on admet que le premier objet détecté a moins de 4 billes et le second au moins 20 billes, ce qui est une hypothèse raisonnable au vu des incertitudes de la détermination des paramètres physiques par notre programme, on peut calculer la probabilité d'être une cellule de ces deux objets. On sait que (voir Fig. 2.5) 0.5% des cellules et 69.5% des agrégats ont moins de 4 billes et que 80% des cellules et 0.5% des agrégats ont plus de 20. On a mis dans la solution 10^5 cellules qui sont marquées en moyenne par 50 billes et $1.5 \cdot 10^7$ billes qui forment en moyenne des agrégats de 3.3 billes. Dans la suspension il y a donc 10^5 cellules et $3 \cdot 10^6$ agrégats. D'après l'équation (5.1), et selon ces hypothèses, le premier objet a une probabilité de 0.02% et le second de 83% d'être une cellule.

Pour conclure, il est possible de travailler sur des signaux enregistrés sur deux capteurs alignés dans un canal et de les utiliser pour distinguer la population spécifique de la population non-spécifique. Cependant, ce travail est actuellement limité et ne permet pas de traiter la totalité des signaux. En effet, il est délicat de déterminer l'écart temporel entre les deux détections d'un même objet puisque leur vitesse dépend de leur position dans le canal. Les signaux ne conservent donc pas systématiquement leur ordre de passage entre le moment où ils sont détectés par le premier et le deuxième capteur. D'autre part, la discrimination sur l'amplitude ne permet pas une distinction suffisante pour un couplage sans erreur car les signaux voisins ayant des amplitudes proches ne sont pas rares. Ainsi, avec des suspensions plus diluées, en billes et en cellules, les erreurs de couplages seraient en fait moins fréquentes puisque la probabilité que deux événements passent dans une fenêtre de temps donnée serait plus faible. Une solution serait donc de diluer les suspensions après marquage avant de les introduire dans la puce. Par manque de temps, cette proposition n'a pas pu être testée.

La solution choisie généralement dans la littérature pour éviter cette dérive due au profil parabolique des vitesses consiste à combiner cette double détection avec une focalisation de flux à la fois verticale et horizontale [56, 80, 87]. Ayant choisi d'éviter toute complexification de la puce microfluidique, dans notre système cette méthode n'est pas réalisable. Cependant, elle donne des résultats intéressants et nous a permis de tester sur les quelques premiers signaux d'une expérience le programme d'ajustement. Il est donc possible d'avoir des informations sur les objets doublement détectés grâce à ce programme. En multipliant ce genre de mesures sur de nombreux échantillons de compositions variées, l'estimation de la probabilité de chaque objet détecté d'être une cellule deviendra de plus en plus précise.

5.3 Comparaison avec méthodes courantes de diagnostic

5.3.1 Test Bandelette

Aucun résultat n'a pu être obtenu avec les tests bandelette effectués, voir Fig. 5.6. En effet, les cellules restent dans la zone de leur dépôt tout en bas de la nitrocellulose, où une coloration est visible. Même les bandelettes à plus forte porosité avec les tampons les plus favorables n'ont pas permis la migration des cellules. L'optimisation de ce test n'était pas l'objet de cette thèse et cette méthode a donc été abandonnée.

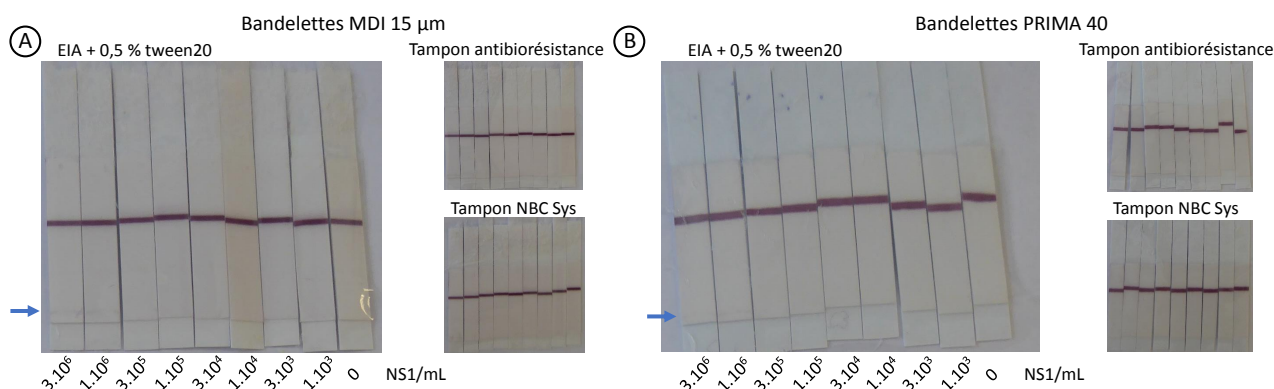


FIGURE 5.6 – Photographies des bandelettes 15 minutes après migration totale des échantillons. A) Tests faits sur bandelettes commerciales MDI de porosité 15 μm dans les trois tampons testés. B) Tests faits sur bandelettes commerciales PRIMA 40 dans les trois tampons testés. Aucune des 6 conditions testées n'a permis la migration des cellules. Seule la bande contrôle, témoin de la migration des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 apparaît, les bandes tests restent blanches. Une légère coloration du bas de la bandelette (indiquée par une flèche bleue) peut être distinguée aux fortes concentrations de cellules, révélant la non-migration des cellules dans la nitrocellulose.

5.3.2 Cytométrie en flux

Les résultats de cytométrie en flux ont été traités² en repérant la population d'intérêt selon la granularité et la taille des cellules repérées. Ensuite, le niveau de fluorescence de cette population a été comparé à celui de l'échantillon contrôle dans lequel les cellules NS1 ont été incubées en tampon seul (autofluorescence des cellules). La Fig. 5.7 montre quelques exemples de résultats obtenus. Pour chaque concentration, l'appareil donne le nombre de cellules comptées marquées spécifiquement. Il est ainsi possible de calculer un pourcentage d'objets détectés. Ce rapport, estimé entre 10 et 20%, varie peu avec la concentration. Les résultats des trois expériences indépendantes sont présentés dans le Tableau 5.3.2.

2. Les expériences et analyses des résultats de la cytométrie en flux ont été réalisées par Anne Wijkhuisen.

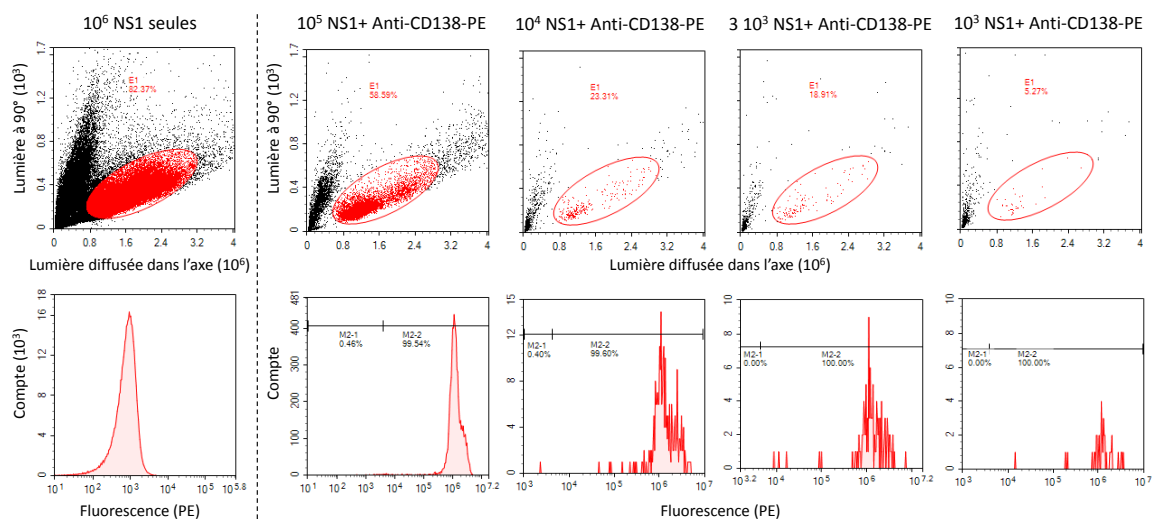


FIGURE 5.7 – Résultats de la cytométrie en flux. Sur la première ligne sont reportés les graphiques montrant la sélection de la population cellulaire d'intérêt (E1) selon leur taille et leur complexité. L'importance relative de cette population parmi l'ensemble des objets détectés est indiquée par un pourcentage. Sur la seconde ligne, les graphiques représentent le niveau de fluorescence de cette population d'intérêt. Deux populations sont distinguées : celle qui n'est pas marquée (M2-1) et celle qui l'est (M2-2). Dans la première colonne sont présentés les résultats de l'échantillon contrôle (cellules non marquées).

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Moyenne ± Ecart-type	Moyenne (%)
Nombre attendu	Nombre effectif				Pourcentage moyen effectif
$2 \cdot 10^4$	2318	6739	3022	4030 ± 2380	20
$6 \cdot 10^3$	868	947	710	840 ± 120	14
$2 \cdot 10^3$	139	251	330	240 ± 96	12
$6 \cdot 10^2$	87	115	55	86 ± 30	14
$2 \cdot 10^2$	43	37	39	40 ± 3	20

Tableau 5.2 – Compte de cellules marquées spécifiquement en cytométrie de flux, (population M2-2). Pour tous les échantillons, des volumes de 200 μ L ont été passés.

Plus de 99% des cellules détectées sont marquées par l'anticorps fluorescent, quelle que soit la concentration considérée. En revanche, le nombre d'évènements comptés représente seulement 10 à 20% des évènements attendus. Ceci s'explique par plusieurs raisons :

- les étapes de lavage et le passage dans l'appareil tue un certain nombre de cellules
- la sélection des cellules en fonction de leur granularité et de leur taille élimine les doublets (ou agrégats) de cellules.

Finalement, on peut estimer que cette technique permet un comptage valide dans ces conditions jusqu'à une concentration de $3 \cdot 10^3$ NS1/mL environ. En dessous de ce seuil, le nombre d'objets est trop faible, et il faudrait donc augmenter le volume de la solution et le temps d'expérience pour un comptage plus sûr.

5.3.3 Sandwich ELISA

Le test sandwich ELISA a été répété 3 fois (chaque concentration en duplicats) dans chaque condition. Les résultats sont donnés sur la Fig. 5.8. Pour chacune des matrices, la limite de détection (au-delà de laquelle le

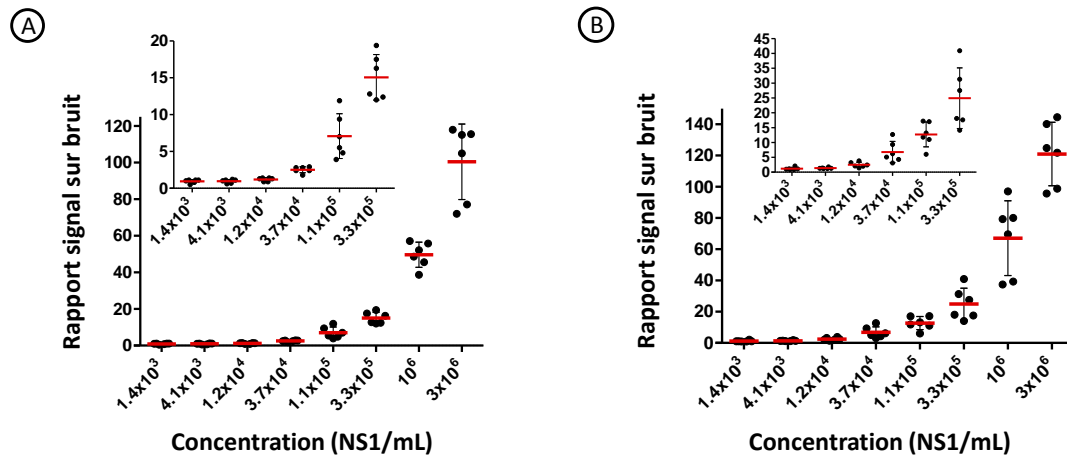


FIGURE 5.8 – Résultats des tests ELISA. Les 3 expériences indépendantes ont été réalisées en duplicats. Les moyennes obtenues pour chaque échantillon sont représentées par une barre rouge dont l'écart-type est donné par une barre d'erreur. A) ELISA des suspensions en PBS. B) ELISA des suspensions en 20% PBS + 80% plasma de lapin.

	PBS	20% PBS, 80% plasma de lapin
Limite de détection	$2.0 \cdot 10^4 \pm 1.8 \cdot 10^4$	$2.7 \cdot 10^3 \pm 2.8 \cdot 10^3$
Limite de quantification	$6.7 \cdot 10^4 \pm 2.9 \cdot 10^4$	$2.7 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^4$

Tableau 5.3 – Résultats ELISA

test peut déterminer la positivité de l'échantillon) et la limite de quantification (au-delà de laquelle le test peut donner une estimation correcte de la concentration de l'échantillon) ont été déterminées avec leurs écart-types respectifs. Ces valeurs sont reportées dans le Tableau 5.3 et une différence significative peut être observée selon la matrice.

Le test est dix fois plus sensible en matrice biologique complexe qu'en tampon physiologique. Cette différence d'un ordre de grandeur provient de l'enregistrement d'un signal plus faible dans les puits contrôle pour le plasma de lapin (dont l'absorbance moyenne + 3 écart-types vaut 0.022) que pour le tampon physiologique (dont l'absorbance moyenne + 3 écart-types vaut 0.033). En effet, les fortes concentrations en protéines du plasma de lapin saturer plus efficacement ces puits contrôles, prévenant l'accroche non spécifique du traceur dans les étapes suivantes. Le rapport signal sur bruit des tests positifs est donc plus fort en matrice biologique, permettant la détection des cellules NS1 à plus basse concentration.

5.4 Discussion

Test	ELISA	Cytométrie de flux	GMR 1 étage
Limite de détection	$2.0 \cdot 10^4$ NS1/mL \pm $1.8 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$ NS1/mL environ	entre 1 et $3 \cdot 10^4$ NS1/mL
Durée du test	5h	2h	2h30
Etapas de lavage	Oui	Oui	Non

Tableau 5.4 – Comparaison des performances du test ELISA, de la cytométrie de flux et du test GMR un étage.

Finalement, les tests ELISA, en cytométrie de flux et le test GMR un étage ont été évalués sur le même modèle biologique simple : des suspensions de cellules NS1 en PBS marquées par des anticorps monoclonaux

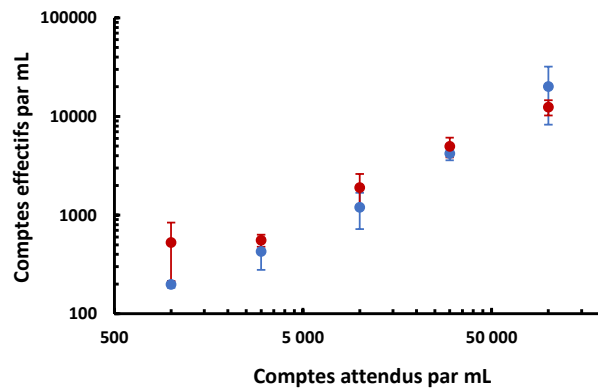


FIGURE 5.9 – Résultats comparés des tests en cytométrie de flux (en bleu) et puce un étage (en rouge).

anti-CD138. Au cours de cette thèse le test bandelette n'a pas pu être adapté à notre système. Les résultats obtenus en PBS sont résumés dans le Tableau 5.4.

Le test le plus performant est la cytométrie en flux qui est plus rapide et détecte les cellules à une plus basse concentration que les deux autres tests, de performances similaires. Cependant, cette technique est très complexe, coûteuse et nécessite beaucoup de matériel (le cytomètre, une centrifugeuse, des anticorps fluorescents). De plus, la bonne réalisation et interprétation de ce test demande les compétences d'un spécialiste. En outre, bien qu'il y ait un facteur 10 d'écart en sensibilité, notre test peut encore être largement amélioré sur plusieurs voies que nous détaillerons dans la Conclusion.

Pour mieux comparer les méthodes qui permettent l'analyse d'évènements un à un, à savoir la cytométrie en flux et la détection avec une puce GMR, la Fig. 5.9 trace le nombre de signaux effectivement comptés par millilitre en fonction du nombre de cellules présentes dans la suspension.

En représentant ces résultats sous cette forme, les deux techniques semblent donner des résultats très proches, de l'ordre de 10 à 20% des évènements attendus. Ce taux pour la cytométrie s'explique par :

- une diminution de la survie cellulaire (due à la centrifugation répétée des cellules et leur passage dans le cytomètre)
- la sélection d'une portion seulement des évènements excluant les cellules groupées et les débris cellulaires.

L'obtention du même taux de détection pour notre test GMR s'explique par des phénomènes différents. Une certaine proportion des cellules est peu marquée (20% ont moins de 20 billes) et d'autres, pourtant bien labélisées et vivantes passent trop haut dans le canal pour être comptabilisées avec le seuil de détection élevé imposé (2.2 μ T) et la surélévation du canal (de 6 μ m).

A 10^3 cellules/mL, les deux techniques donnent cependant des résultats très différents. Alors que la cytométrie en flux continue de détecter un pourcentage stable des évènements attendus, le test GMR détecte plus d'évènements. Ces signaux supplémentaires proviennent en fait de billes libres agrégées en solution. Alors que leur nombre augmente très faiblement avec la diminution de la concentration cellulaire, ils représentent, de fait, une proportion de plus en plus importante des signaux comptés, en devenant la majeure partie à ce seuil.

De plus, les deux méthodes sont très différentes et n'ont pas le même objectif. Leur point commun, et la raison pour laquelle nous les avons comparées, est de détecter une par une des cellules d'intérêt de façon spécifique parmi plusieurs populations cellulaires. La cytométrie bien qu'efficace est complexe, nécessite des experts et est chère. Elle permet de multiplexer les mesures. Le test GMR, en revanche, n'a pas pour objectif de multiplexer. On le souhaite rapide, simple, sans étape de lavage, peu cher et sensible. En ce sens, il est plus proche du test ELISA.

Le test ELISA, lorsqu'il est réalisé dans une matrice qui lui convient, est environ dix fois plus sensible que notre test. Cependant, il nécessite des étapes de lavages et doit être réalisé en laboratoire, par du personnel

formé. Le test GMR et l'ELISA ont cependant une vraie différence dans leur principe : alors que l'ELISA détecte une concentration, le test GMR détecte les objets un par un. Cette détection individuelle offre des perspectives intéressantes pour l'augmentation de sa sensibilité. En effet, la limite de sensibilité de notre test ne provient pas de son incapacité à détecter correctement les événements un par un mais du nombre trop important d'évènements non-spécifiques provenant des agrégats. Pour améliorer encore ses performances, il est donc impératif de réduire les signaux provenant des agrégats afin de mieux les distinguer de ceux provenant de cellules. L'augmentation de la sensibilité du test passera nécessairement par cette étape.

Notons que la sensibilité du test ne nécessite pas l'amélioration de la sensibilité du capteur puisque nous avons au contraire dû augmenter la limite de détection réelle pour avoir une meilleure discrimination entre les signaux spécifiques et non-spécifiques. Une diminution du bruit des capteurs pourrait en revanche faciliter le traitement des données. Ce travail sort cependant du cadre de cette thèse qui n'avait pas pour objectif d'améliorer les capteurs GMR.

Le nombre de billes par objet obéit à une distribution aussi bien pour les agrégats que pour les cellules (voir §3.6). Or, ces deux distributions se recouvrent. L'objectif est de définir un nombre de billes critique au-dessus duquel l'objet détecté est plus probablement une cellule avec un risque de 5% par exemple. Ce seuil critique doit être fixé à partir de résultats expérimentaux. Pour remonter à cette information à partir des signaux, nous avons montré, comme d'autres avant nous [56,80], que les résultats obtenus à partir de deux capteurs côte à côte pouvaient être utilisés. Malheureusement, sans focalisation de flux, les vitesses dans le canal étant très variées selon la hauteur de passage, cette méthode n'est pas efficace sur de longs temps d'écoulement où le couplage de signaux est délicat. Ainsi, pour aller plus loin, et pouvoir coupler les signaux deux par deux simplement quel que soit le volume passé et sans introduire de focalisation de flux, un deuxième dispositif a été développé : le capteur deux étages qui possède des capteurs au-dessus et au-dessous du canal microfluidique.

Chapitre 6

Capteur deux étages

Le capteur deux étages est un dispositif conçu pour mieux identifier la nature des objets magnétiques détectés, verrou principal dans l'étude réalisée avec le capteur un étage. En effet, en enregistrant simultanément les signaux générés par un même objet lors de son passage dans la puce par les capteurs disposés au-dessus et en dessous du canal, il devient possible de découpler les effets des différents paramètres mis en jeu. La hauteur de passage et le nombre de billes agissent sur l'amplitude des signaux. Lorsqu'un objet (possédant un nombre de billes donné) est détecté par deux capteurs, la différence d'amplitude entre les deux signaux s'explique par une distance à chaque capteur différente, qu'il devient possible d'estimer. De façon similaire, la vitesse et la hauteur de passage agissent sur leur largeur, et nous pouvons suivre le même raisonnement (la vitesse est la même du point de vue des deux capteurs). La déconvolution de l'influence de ces paramètres grâce aux deux signaux permet alors de les déterminer avec une précision qu'il faudra évaluer en réalisant plusieurs expériences. Pouvoir estimer le moment magnétique de l'objet détecté et donc le nombre de billes attachées, permet d'évaluer la probabilité qu'il s'agisse d'une cellule marquée. L'avantage de cette géométrie des capteurs face à face (selon l'axe z) sur la géométrie des capteurs voisins (selon l'axe y) est la plus grande facilité de couplage des signaux deux à deux. En effet, alors que le délai de repérage d'un même objet entre deux capteurs voisins dépend fortement de sa vitesse (et donc de sa position selon les axes x et z , puisque le profil des vitesses est parabolique), il est quasi nul dans le cas de deux capteurs face à face. Ce nouveau dispositif devrait donc nous permettre d'augmenter la spécificité et la sensibilité du test par rapport à la puce un étage, précédemment utilisée. Cependant, le bon fonctionnement d'un tel dispositif nécessite plusieurs prérequis.

- Les capteurs haut et bas doivent être positionnés exactement face à face (écart selon y inférieur à quelques micromètres) pour permettre une bonne synchronisation des signaux générés et donc une bonne identification des couples de signaux.
- Le canal doit être parfaitement hermétique.
- La position selon la verticale du capteur du haut par rapport à celle du capteur du bas (écart selon z des capteurs) doit être connue avec la meilleure précision possible. En effet, nous verrons que c'est une donnée essentielle à la détermination de la position de l'objet détecté.

Ce dispositif possède un grand potentiel mais sa réalisation est plus exigeante que celle de la puce précédente.

Dans ce dernier chapitre, nous décrirons les différentes pistes de fabrication explorées ainsi que la solution retenue. Nous expliquerons également les simulations effectuées pour reproduire les signaux corrélés obtenus avec ce nouveau laboratoire sur puce et nous mettrons ainsi en évidence son potentiel. Enfin, les premiers résultats obtenus seront présentés.

6.1 Fabrication

Chaque puce possède quatre capteurs GMR (de $3\ \mu\text{m}$ de large et $120\ \mu\text{m}$ de long) au-dessous et au-dessus de son canal microfluidique, alignés deux à deux. La Fig. 6.1B présente une photographie de cet alignement.

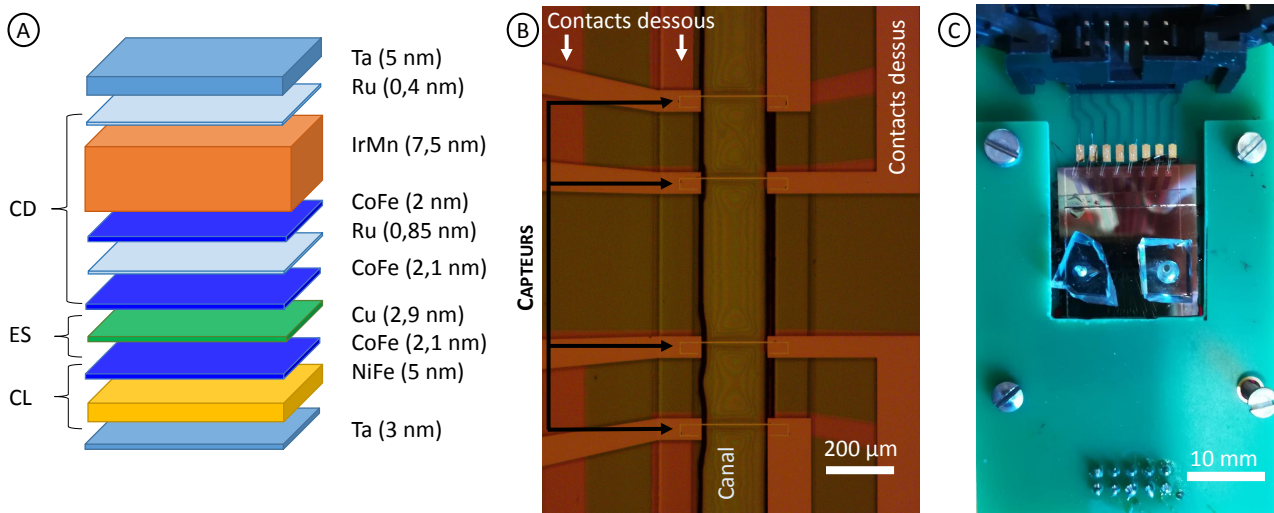


FIGURE 6.1 – A) Schéma des couches composant la GMR. Les abréviations CD et CL signifient respectivement couche dure et couche libre. L'abréviation ES signifie espaceur. B) Photographie sous microscope de l'alignement des capteurs haut et bas. C) Photographie du dispositif deux étages entièrement monté.

6.1.1 Dépôt des couches GMR

Comme il est nécessaire lors de la fabrication du dispositif deux étages d'aligner précisément la série de capteurs au-dessus du canal avec celle du dessous, le substrat du capteur du dessus doit être transparent. En revanche, le capteur du dessous peut être fabriqué sur silicium ou sur verre. Des couches magnétiques, mises au point au sein de notre laboratoire (LNO) et optimisées dans le cadre de différents projets, ont donc été déposées¹ sur des substrats en verre et en silicium. Elles ont pour composition (Fig. 6.1A) $\text{Si} \backslash \backslash \text{Ta}_3 \text{NiFe}_5 \text{CoFe}_{2.1} \text{Cu}_{2.9} \text{CoFe}_{2.1} \text{Ru}_{0.85} \text{CoFe}_2 \text{IrMn}_{7.5} \text{Ru}_{0.4} \text{Ta}_5$, où les nombres donnés correspondent aux épaisseurs en nanomètres des différentes couches minces. Cet empilement a des propriétés très proches de celles des couches utilisées pour le capteur un étage, c'est-à-dire une forte sensibilité mais une hystérésis non négligeable. Le Chapitre 1 revient plus en détails sur ces problématiques et nous y avons notamment expliqué au §1.2.4 que l'hystérésis pouvait être corrigée par un champ de bias, présent dans notre montage de champ homogène lors des expériences.

6.1.2 Fabrication des capteurs

Les étapes de fabrication sont identiques pour le dispositif deux étages et pour le dispositif un étage, seul le masque, donnant leurs formes aux capteurs, contacts et couches de passivation, change. Le protocole est présenté au §4.1.1 et résumé en Annexe L. Deux séries de capteurs sont fabriquées par disque de silicium et de verre, ils sont ensuite détachés² l'un de l'autre grâce à la découpe diamant. Les 2 séries de 4 capteurs qui vont constituer notre dispositif sont disposées tête bêche dans le four de recuit sous champ³ afin d'orienter les couches dures perpendiculairement aux couches libres dont l'aimantation est donnée par la forme du capteur (voir §1.2.3). Cette configuration tête bêche (identique à celle du montage final) permet d'avoir les éventuels défauts d'orientation de l'aimantation dans le même sens pour les deux couches et par conséquent de pouvoir les corriger avec le même champ bias (voir §1.2.4).

1. Les dépôts de couches GMR et l'optimisation de leurs paramètres ont été réalisés par Claude Fermon, Myriam Pannetier-Lecoeur et Aurélie Solignac.

2. Sébastien Delprat a découpé tous nos capteurs.

3. Le recuit sous champ est réalisé par Claude Fermon ou Aurélie Solignac.

6.1.3 Montage du dispositif deux étages

Différentes pistes ont été envisagées pour la fabrication de ce canal hermétique d'une vingtaine de micromètres de haut, d'une centaine de micromètres de large et permettant un alignement au micromètre près des capteurs haut et bas. La mise au point de sa fabrication a demandé plus d'un an.

Solutions envisagées pour le canal du capteur deux étages

La fabrication du capteur deux étages est délicate et trouver un protocole fiable est complexe⁴. Dans tous les protocoles testés, des trous ont été percés au LASER (EXCIMER) dans le substrat qui compose la partie supérieure du dispositif au niveau des réservoirs du canal microfluidique afin d'y introduire les échantillons.

L'alignement des capteurs du dessus et du dessous a été effectué sous le microscope de l'aligneur MJB3 (Karl Süss, 5mW/cm², 405 nm). Les solutions envisagées sont résumées dans le Tableau 6.1.

Solution envisagée	Formation canal	Collage et alignement	Inconvénients
Résine K-Cl (Kloé)	Lithographie LASER	Colle K-PUm (Kloé)	Accroche K-Cl/verre médiocre Lithographie chronophage Collage délicat et irréversible
Feuilles métalliques (cuivre, laiton et cuivre béryllium)	Photolithographie, gravure au chlorure de fer	Colle à métaux	Inhomogénéités gravure Roulement de la feuille Froissements à la manipulation
Feuilles de polymères Flexdym™ (de Eden Microfluidics)	Photolithographie	Pression et chauffage	Risque d'endommagement des capteurs Collage à froid impossible
Kapton, 250 µm	Découpe LASER	Colle	Corne les feuilles Canal trop haut
SU-8	Photolithographie	Colle NOA	Collage délicat

Tableau 6.1 – Ensemble des procédés envisagés pour la fabrication des puces deux étages et leurs inconvénients.

Solution retenue

Finalement, la solution retenue consiste à fabriquer un canal en SU-8 centré sur la série de capteurs du substrat de la partie basse du dispositif par photolithographie et de le fermer avec la seconde partie du dispositif qui sert donc de capot, grâce à de la NOA (Norland Optical Adhesive 81, fiche produit en Annexe K) réticulée sous la MJB3, après alignement des deux séries de capteurs. Cette méthode est longue (quelques heures à cause des différents recuits) mais elle a de loin le meilleur taux de réussite parmi toutes les techniques testées. L'avantage de ce protocole est qu'il est réversible. En cas d'erreur, les deux substrats peuvent être séparés en les laissant plusieurs heures dans de l'acétone chauffé à 60°C. Le montage a été décrit plus en détails au §4.1.1 en désignant le capteur du haut, sur substrat de verre, par le terme de « capot » de verre. En effet, après avoir mis au point ce protocole, nous l'avons également utilisé pour le dispositif un étage en remplacement du canal en PDMS.

Le substrat du bas est enduit d'une fine couche d'accroche de 2.5 µm SU-8 sur laquelle sont lithographiés les murs en SU-8 du canal. Leur hauteur est mesurée au profilomètre mécanique et vaut environ 20 µm. L'étape la plus délicate consiste à effectuer un collage préliminaire du substrat du haut, qui sert de capot, sur les murs du canal avec une fine couche de NOA tout en alignant les deux séries de capteurs. L'épaisseur de NOA et la

4. Ce travail a été réalisé en grande partie (KCl, feuilles polymères, Kapton et SU-8) en collaboration avec François-Damien Delapierre (post-doctorant au LNO).

pression à appliquer doivent être précisément ajustés pour que le collage soit hermétique mais ne bouche pas le canal. Une autre difficulté provient de la présence des contacts opaques, sur le capteur du haut, empêchant donc la portion de NOA masquée d'être réticulée lors de l'insolation par les UV à la MJB3. Une solution a été trouvée pour éviter que le NOA non réticulé n'entre progressivement dans le canal et le bouche. Il s'agit d'une insolation sur le côté grâce à une fibre optique UV souple. Malheureusement, cette lampe n'est pas aussi puissante que la MJB3 et la réticulation sur le côté prend plusieurs minutes.

L'épaisseur de NOA ne peut pas être mesurée lorsque le canal est scellé. Or, il est important de connaître cette épaisseur qui correspond à la distance séparant les capteurs du haut du canal. Cette colle a donc été déposée sur une lame de verre vierge avec les mêmes paramètres que pour la fabrication du laboratoire sur puce. Après insolation, son épaisseur a été mesurée au profilomètre mécanique. Elle vaut environ $4.5 \mu\text{m}$. L'utilisation d'un profilomètre optique serait cependant certainement plus précis.

Au cours de ma thèse, cinq dispositifs deux étages ont été réalisés avec ce protocole.

6.1.4 Caractérisation en fin de fabrication

Parmi les cinq dispositifs fabriqués, un seul a pu être utilisé, les quatre autres ayant été endommagés prématurément à cause de mauvais dépôts de la couche de passivation (cible de la machine de dépôt par pulvérisation en fin de vie) ou de tensions mécaniques appliquées trop fortes. Chacune des trois premières observations a permis d'améliorer une étape de la fabrication (mise au point de supports, changement de cible, utilisation d'un substrat de verre plus épais). Cependant, les capteurs du haut du quatrième montage ont également été endommagés prématurément sans cause identifiée. La dégradation des propriétés des GMR sur verre peut s'expliquer par une rugosité plus importante de ce substrat par rapport au silicium.

Le dernier dispositif (en verre $500 \mu\text{m}$ sur silicium $300 \mu\text{m}$) a donc été monté en vérifiant la résistance des 8 pistes tout au long du procédé de fabrication afin de comprendre quelle étape avait détruit les capteurs précédents. Aucune variation de résistance n'a été mesurée au cours de production. En fin de fabrication, la sensibilité de chaque capteur a été mesurée et trouvée inférieure pour les capteurs du haut que pour les capteurs du bas (voir Tableau 6.2).

Substrat du capteur	Géométrie du capteur	Résistance	Sensibilité hors aimant	Sensibilité avec aimant	Niveau de bruit global
Verre	Yoke de $3 \times 120 \mu\text{m}$	$730 - 770 \Omega$	$0.6 - 0.9\%.\text{mT}^{-1}$	$0.9 - 1.2\%.\text{mT}^{-1}$	$40 - 50 \mu\text{V}$
Silicium	Yoke de $3 \times 120 \mu\text{m}$	$670 - 700 \Omega$	$0.9 - 1.4\%.\text{mT}^{-1}$	$1.8 - 1.5\%.\text{mT}^{-1}$	$25 - 40 \mu\text{V}$

Tableau 6.2 – Caractéristiques des capteurs deux étages. Le niveau de bruit est donné sur la bande de fréquences utilisée ($15 \text{ Hz} - 10 \text{ kHz}$).

Le capteur a ensuite été fixé dans le montage expérimental et sa position ajustée selon la procédure décrite au §4.3.2. Une nouvelle mesure de sensibilité dans le champ de l'aimant a à nouveau mis en évidence que les performances des capteurs du bas sont meilleures que celles des capteurs du haut, toutes restent cependant correctes. Les mesures de sensibilité dans l'aimant et le niveau de bruit global sont donnés pour chaque capteur utilisé dans le §6.3.

6.2 Simulations

6.2.1 Principe

Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'intérêt de ce dispositif est la détection simultanée d'un objet magnétique par les capteurs répartis au-dessus et au-dessous du canal. Il permet alors de combiner les informations enregistrées pour remonter aux caractéristiques magnétiques de l'objet à l'origine des signaux.

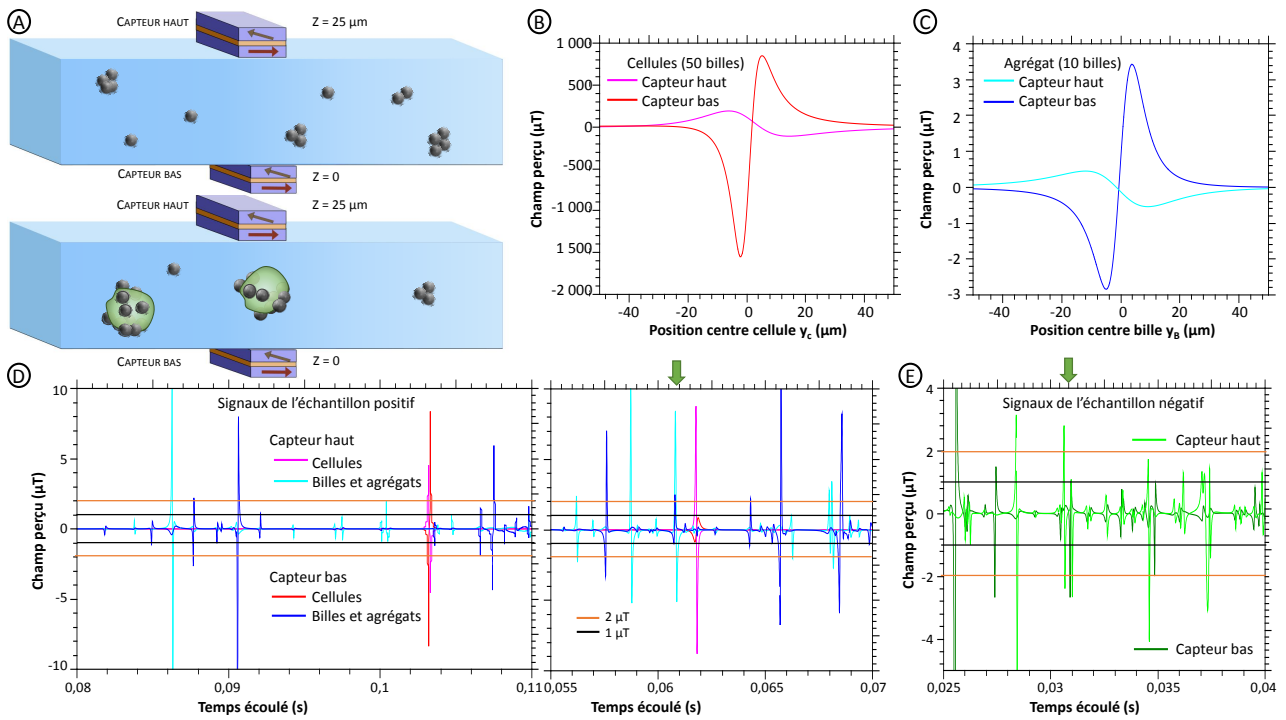


FIGURE 6.2 – A) Schéma de l’écoulement d’un échantillon négatif et d’un échantillon positif dans une puce deux étages. B) Exemple de simulation de passage d’une cellule labélisée par 50 billes dans un capteur deux étages à 7 μm du capteur du bas et 18 μm du capteur du haut. La position de chaque bille sur cette cellule de 10 μm de diamètre est aléatoire. C) Exemple de simulation de passage d’un agrégat de 10 billes dans un capteur deux étages à 7 μm du capteur du bas et 18 μm du capteur du haut. D) Deux portions exemples du passage d’un écoulement simulé d’un échantillon positif dont la contribution des cellules et des marqueurs libres est tracée en couleurs distinctes. E) Une portion exemple du passage d’un écoulement simulé d’un échantillon négatif. Des flèches vertes épaisses indiquent les deux couples de signaux d’agrégats dont les deux membres dépassent les 2 μT (sur les 22 signaux détectables d’au moins un des deux côtés).

L’objectif est de détecter un maximum d’événements des deux côtés pour identifier un maximum d’objets. Les distances entre les séries de capteurs et le canal (épaisseur de la couche d’accroche en SU-8 en bas et épaisseur de la colle NOA en haut) doivent être les plus faibles possible. De même, la hauteur du canal doit être minimisée pour optimiser le nombre d’objets détectés mais elle doit être suffisamment grande pour éviter les bouchages. Une hauteur proche de 20 μm semble être un bon compromis.

6.2.2 Etude théorique sur le capteur deux étages

La géométrie du dispositif est testée grâce à de la modélisation, voir Fig. 6.2 A. Dans ces simulations, l’équation (3.2) présentée au Chapitre 3 est reprise deux fois. Une fois avec une position verticale du capteur du bas $z_C = 0$, et une fois avec $z_C = 25 \mu\text{m}$ pour modéliser les champs magnétiques au niveau du capteur du haut. Un exemple de ces simulations est donné sur la Fig. 6.2 pour un gros agrégat de 10 billes (B) et pour une cellule moyennement labélisée par 50 billes (C) passant chacun à 7 μm du bas du canal. Dans cet exemple, en admettant un seuil de détection de l’ordre de quelques microteslas comme précédemment observé, l’agrégat n’est détectable que par le capteur du bas, alors que la cellule donne des signaux détectables par le haut et le bas du canal.

6.2.3 Simulation du flux

De la même façon que dans le §3.2.2, 10 simulations de passage d’échantillons positifs et négatifs dans la puce deux étages ont été effectuées. En reprenant le même algorithme, chaque objet de l’échantillon est placé aléatoirement en amont du capteur à l’instant $t = 0$, sa vitesse est calculée en supposant un profil parabolique

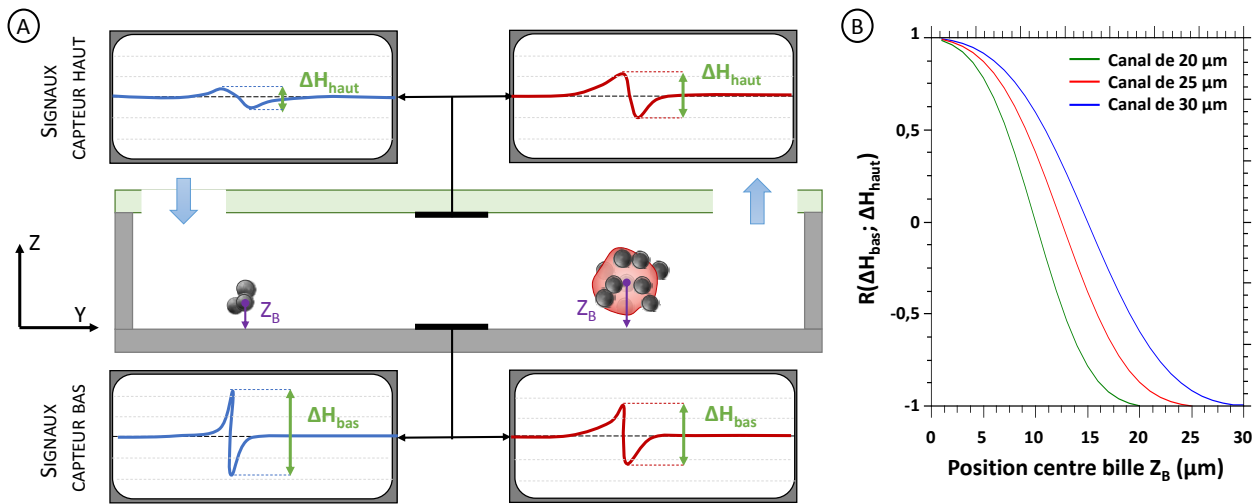


FIGURE 6.3 – A) Schéma de l'écoulement d'un échantillon positif dans un capteur deux étages. Les signaux générés sur le capteur haut et le capteur bas sont donnés pour le passage d'un agrégat et d'une cellule marquée. B) Courbes de $R(\Delta H_{haut}; \Delta H_{bas}) = (\Delta H_{haut} - \Delta H_{bas}) / (\Delta H_{haut} + \Delta H_{bas})$ en fonction de la distance de l'objet au capteur du bas pour 3 tailles de canaux. Sur ces simulations les épaisseurs de couche d'accroche et de colle sont nulles.

des vitesses et la simulation calcule, pas à pas, la nouvelle position de chaque objet et le champ résultant sur la surface du capteur.

Un exemple des résultats des 20 simulations est donné Fig. 6.2 D pour un échantillon positif et E pour un échantillon négatif. Les signaux des échantillons positifs sont plus souvent détectables par un couple de capteurs face à face que les signaux des échantillons négatifs. Lorsqu'ils ne le sont pas (2ème graphique Fig.6.2 D) c'est qu'ils passent significativement plus proche d'une des parois et cela a alors un impact visible sur la largeur des signaux, ce qui n'est pas le cas pour les signaux d'agrégats qui ne sont visibles par les deux capteurs que proche du milieu du canal. Pour attribuer directement un nombre de billes à chaque signal détecté par un couple de capteurs face à face, un algorithme d'ajustements a été mis au point et testé sur ces simulations.

6.2.4 Programme d'ajustements des signaux réels

Les signaux de chaque voie (correspondant chacune à un capteur) sont triés par les programmes décrits au §5.1. Lorsque l'acquisition est réalisée par des capteurs face à face, les signaux sont couplés deux par deux grâce à leur décalage temporel. L'algorithme de couplage est le même que celui mis au point pour traiter les données issues de deux capteurs côte à côte, décrit au §5.1.3, seul le critère de couplage change.

Dans le cas des capteurs face à face, le critère de couplage est simple : le décalage temporel entre les signaux est inférieur à 100 μs (20 acquisitions). En théorie les pics sont simultanés, mais comme un point est acquis toutes les 5 μs , qu'il peut y avoir un écart de 1 ou 2 μm entre les capteurs et que les fluctuations de bruit peuvent décaler légèrement le maximum, une marge de 20 points semble raisonnable. Il faudra confirmer cette marge sur des expériences réelles.

Ensuite, à partir des signaux couplés et en appliquant une procédure en trois temps décrite ci-dessous, une proposition d'objet physique avec une vitesse, un nombre de billes et une hauteur de passage expliquant les deux signaux est obtenue avec une estimation de l'erreur commise par le programme (correspondant au désaccord entre les deux ajustements).

- Les signaux enregistrés par les deux capteurs sont ajustés de manière indépendante en bloquant le nombre de billes à une valeur arbitraire. Les courbes théoriques obtenues sont plus lisses que les courbes expérimentales, la détermination de leurs extrema est donc plus correcte car moins dépendante du niveau de bruit.
- La comparaison des amplitudes de ces ajustements permet de déduire la hauteur de l'objet. En effet,

pour une géométrie du canal connue, le rapport de la différence sur la somme des amplitudes perçues par les deux capteurs ($R(\Delta H_{haut}; \Delta H_{bas}) = (\Delta H_{haut} - \Delta H_{bas}) / (\Delta H_{haut} + \Delta H_{bas})$) suit une courbe ne dépendant que de la hauteur de l'objet par rapport au capteur du bas Z_B pouvant donc être déterminée (en supposant un objet ponctuel). La Fig. 6.3 présente un schéma de principe et cette courbe pour différentes géométries.

- Un nouvel ajustement des deux courbes peut alors avoir lieu en fixant cette fois le paramètre Z_B connu. L'estimation du nombre de billes comportant l'objet et de sa vitesse est alors obtenue selon les deux capteurs. La comparaison des paramètres obtenus sur les deux voies permet d'avoir une idée de la nature de l'objet et de l'incertitude de la méthode de détermination des caractéristiques de cet objet.

Ce programme a été testé sur les signaux théoriques obtenus par la simulation d'un écoulement d'un échantillon positif et d'un échantillon négatif. Le Tableau 6.3 et la Fig. 6.4 présentent quelques résultats.

Objet simulé	Z (nm)	Valeurs obtenues pour la voie						Moyenne des écarts pour N	
		1			2			V/R (%)	V/V (%)
		N	v (cm/s)	ψ (°)	N	v (cm/s)	ψ (°)		
1 bille	2 790	1.01	7.5	251	0.99	7.8	251	0	2
1 bille	18 117	0.7	11	34	0.8	7.5	61	25	13
2 agrégats*	6 383	10.8	7.8	47	11.2	19	48	2 objets !	4
Agrégat (6 billes)	6 897	6.2	20	36	6.1	23	33	2.5	1.6
Agrégats (7 billes)	20 170	6.7	16	62	6.4	16	62	6.4	4.6
Agrégats (11 billes)	18 997	10.5	16	109	11	14	146	2.2	4.7
Cellule (15 billes)	4 080	17	19	175	16	21	175	10	6.1
Cellule* (75 billes)	10 640	69	6.9	100	66	7.3	86	10	4.4
Cellule (100 billes)	4 880	113	22	72	107	24	69	10	5.5

Tableau 6.3 – Sur des signaux dans les deux types d'échantillons comparaison des caractéristiques proposées par le programme d'ajustement appliqué aux deux voies. Le canal fait 15 mm de long, 100 μm de large et 25 μm de haut ($Z_{cap1} = 0$ et $Z_{cap2} = 25 \mu\text{m}$) et la pression appliquée à son entrée est fixée à 300 mbar. La valeur de Z déterminée par le programme est donnée par rapport au capteur du bas. La qualité de l'ajustement est décrite par la valeur moyenne des écarts entre d'une part, le paramètre obtenu par l'ajustement d'une voie et la valeur réelle de la simulation (V/R) et d'autre part, le paramètre obtenu par l'ajustement de la voie 1 et celui de la voie 2 (V/V). Ces écarts sont donnés pour le paramètre N car c'est ce paramètre dont nous avons besoin pour trier les signaux de cellules de ceux des agrégats. Les objets signalés par un astérisque sont ceux présentés sur la Fig. 6.4.

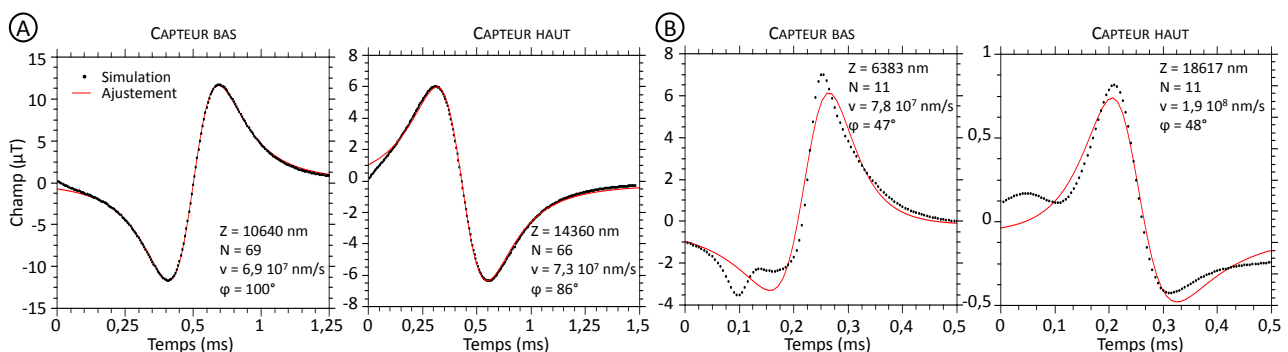


FIGURE 6.4 – Deux exemples d'ajustements des signaux simulés par ce programme. A) Simulation du passage d'une cellule de 75 billes dans le canal. B) Simulation du passage de deux agrégats dans le canal.

Ces résultats sont encourageants (la plupart des ajustements obtiennent moins de 10% d'erreur). Cependant, ils reposent sur l'ajustement de signaux simulés, les simulations étant basées sur la même équation. Leur efficacité sur signaux réels peut être mise en doute. En effet, de nombreux paramètres peuvent fausser les résultats. Certaines de ces conditions arrivent aussi dans nos simulations et sont donc déjà observables sur cette étude :

- le passage de plusieurs objets en simultané,
- une répartition très inhomogène de billes à la surface d'une cellule.

Mais de nouvelles sources d'erreurs s'ajoutent lors des expériences :

- une erreur importante sur la détermination de la sensibilité d'un des capteurs,
- la superposition d'un fort niveau de bruit à l'un des signaux,
- une erreur importante sur la position relative des capteurs,
- un ajustement imprécis ou faux de l'un des deux signaux (dû à un mauvais cadrage du signal par exemple).

Il sera donc important d'évaluer l'efficacité de ce programme sur des signaux réels. Ceci pourra être fait en calculant l'écart entre les valeurs des paramètres proposés pour l'ajustement de la voie 1 et de la voie 2. D'autre part, les échantillons ayant été bien étudiés au Chapitre 2, les résultats obtenus pourront être comparés aux estimations de répartition des billes dans les échantillons positifs et négatifs.

6.3 Résumé des expériences

La préparation, le montage et le déroulement d'une expérience avec le dispositif deux étages sont les mêmes que ceux d'une expérience avec le dispositif un étage et ont été décrits au §4.3. L'enregistrement des données est lancé 10 secondes avant la mise en pression du réservoir contenant les échantillons.

Deux expériences ont pu être réalisées avec ce nouveau dispositif. Elles sont présentées dans le Tableau 6.4.

	Jour 1	Jour 2
Capteur	Capteur A	
Distance minimale/capteur bas	2.5 μm	
Hauteur du canal	20 μm	
Distance minimale/capteur haut	4.5 μm	
Lot de billes	7	
Sensibilité (%. mT^{-1})	1.5 & 1.2	1.8 & 0.88
Incertitude (%. mT^{-1})	± 0.2 & ± 0.2	± 0.3 & ± 0.2
Délectivité (μT)	1.6 & 3.3	2.1 & 4.5
Incertitude (μT)	± 1.8 & ± 4.0	± 3.0 & ± 6.3
Volume passé/échantillon (μL)	200	
Matrice	PBS	
Echantillon (/mL)	Passé (1) ou non (0)	
10^5 NS1 + anti-CD138 Dynal	0	1
10^4 NS1 + anti-CD138 Dynal	0	1
10^3 NS1 + anti-CD138 Dynal	0	1
(-) 10^5 NS1 + IpaD315 Dynal	0	1
(-) anti-CD138 Dynal	1	1

Tableau 6.4 – Conditions expérimentales des deux expériences faites avec le dispositif deux étages. Les contrôles négatifs sont signalés par un signe négatif. Les propriétés des capteurs du bas, sur silicium, sont données avant celles du haut, sur verre.

Malheureusement, beaucoup de bruit a perturbé ces mesures. Comme signalé dans le §6.1.1, les capteurs du haut ont une sensibilité inférieure et un niveau de bruit supérieur aux capteurs du bas. Ces deux expériences ont ainsi été gênées par un fort niveau de bruit, notamment par l'apparition de RTN. Le capteur du haut, sur verre, a vu sa résistance augmenter (1 100 Ω en fin d'expérience au lieu de 750 initialement). Le niveau de bruit est demeuré variable augmentant et diminuant de façon apparemment aléatoire. Les valeurs indiquées dans le tableau sont celles valables en début d'expérience.

Afin d'améliorer le traitement de données très bruitées nous avons modifié le traitement initial. Au lieu du programme de repérage des pics utilisé pour le capteur un étage et décrit au §5.1, un nouveau programme de traitement du signal a été mis au point⁵. La technique permet, par des combinaisons de filtres numériques linéaires et non-linéaires de déterminer les positions des événements grâce à un trigger de Schmitt qui se déclenche sur un signal que nous générons. Il devient alors possible d'extraire leur amplitude pic à pic ainsi que leur date. Cela est réalisé sur chacune des voies indépendamment. Ensuite, ces dates sont comparées entre les voies afin de déterminer s'il y a coïncidence temporelle ou non. S'il y a coïncidence temporelle, alors elle est enregistrée. Des paramètres permettent d'intervenir sur les filtres et la taille de leurs fenêtres, sur les seuils du trigger et sur la zone de recherche des coïncidences. La valeur de la zone de recherche des coïncidences n'a pas encore été réellement optimisée. Les valeurs de 15, 30, 75, 150 et 300 points ont été testées, et sur chacun des échantillons, le nombre de coïncidences obtenus ne variait pas entre 15 et 30 et très peu entre 30 et 75. La valeur 15 a donc été utilisée pour cette première analyse rapide, mais plus de vérifications s'imposent pour la suite.

Une fois ces coïncidences établies, les signaux correspondants ont été ajustés par le programme décrit au §6.2.4.

6.4 Résultats

L'ensemble des données n'a pas été totalement traité. Cependant quelques résultats intéressants ont été obtenus.

Avec les critères très restrictifs utilisés pour le repérage des signaux d'une part (corrélation \times moyenne locale $> 9 \times$ niveau bruit) et la coïncidence d'autre part (15 points d'écart maximum), nous avons obtenu un nombre très faibles de signaux comptés simultanément par les deux capteurs face à face pour chaque échantillon testé (62 signaux pour l'échantillon contenant 10^5 NS1/mL avec les Dyna-anti-CD138, 2 pour l'échantillon contenant 10^4 NS1/mL avec les Dyna-anti-CD138 et 6 pour tous les autres). Ce très faible nombre ne nous permettra donc pas de faire de statistiques sur ces résultats.

De plus, parmi ces signaux, certains sont mal ajustés. Sur les données ainsi traitées aucune coïncidence correcte n'a été obtenue pour les échantillons négatifs.

Sur les données correctement corrélées dont quelques exemples sont donnés par la Fig. 6.5 et le Tableau 6.5 nous pouvons remarquer que les hauteurs attribuées aux objets sont toutes entre 12 et 18 micromètres. Cela correspond bien à nos attentes, les signaux détectés des deux côtés sont situés dans la région centrale, légèrement vers le capteur du haut car il a une détectivité plus faible.

Nom de l'objet	Z (nm)	N_1	N_2	v_1 (cm/s)	v_2 (cm/s)	ψ_1 (°)	ψ_2 (°)	Moyenne des écarts (N)
A	15 042	43.6	30.5	5.3	6.6	102	110	35.4%
B	12 125	54.6	40.4	6.5	12	102	106	29.9%
C	13 341	38.3	36.6	8.2	9.3	97	102	4.5%
D	15 521	61.9	54.1	8.0	10	101	104	13.4%

Tableau 6.5 – Quelques exemples d'ajustements de signaux réels.

5. Ce programme, conçu par le Laboratoire d'Electronique et de Traitement du Signal du service, fera l'objet d'une publication voire d'un dépôt de brevet, il ne peut donc totalement être divulgué pour l'heure

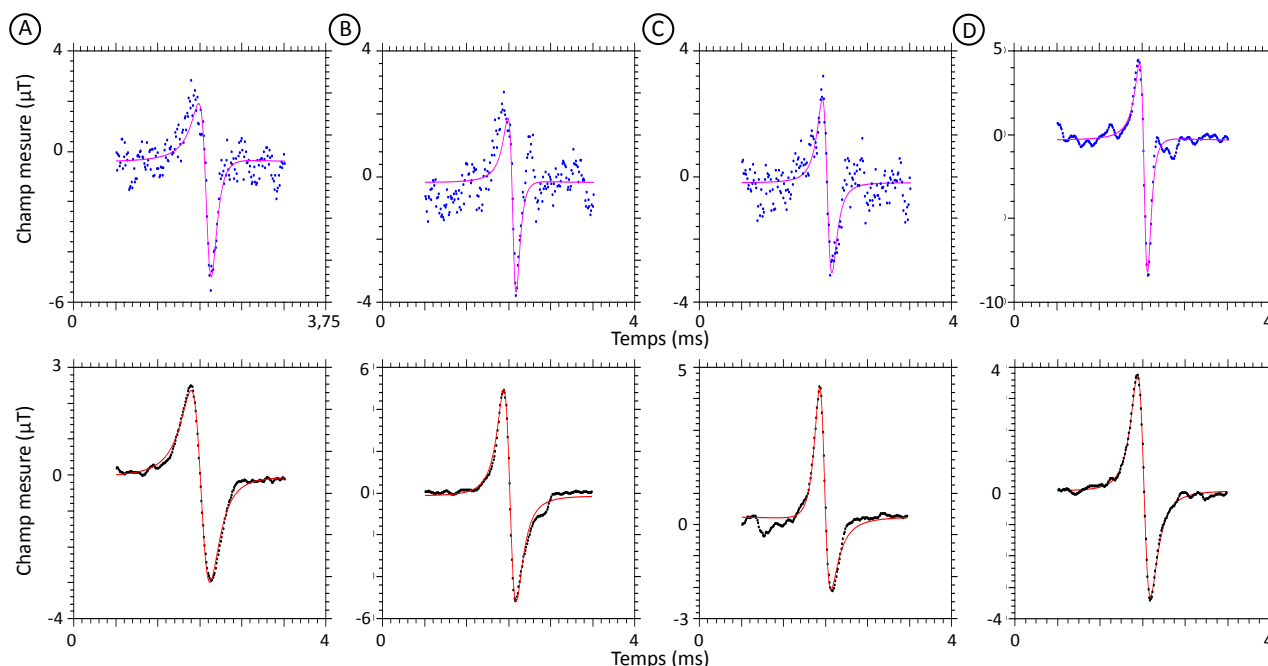


FIGURE 6.5 – Exemples de corrélations correctes des signaux réels lors de la seconde expérience. Les signaux enregistrés par le capteur du haut sont en haut de la figure tandis que les signaux enregistrés par le capteur du bas sont en bas. Les signaux expérimentaux sont représentés par les points tandis que les ajustements proposés par le programme sont représentés par une ligne continue. Les paramètres trouvés pour ces signaux sont donnés dans le Tableau 6.5. A), B) et C) Signaux issus de l'enregistrement des résultats du passage de l'échantillon 10^5 NS1 + anti-CD138 Dyna1. D) Signaux issus de l'enregistrement des résultats du passage de l'échantillon 10^4 NS1 + anti-CD138 Dyna1.

D'autre part, parmi les 54 signaux correctement ajustés par le programme, 46 ont des écarts entre les valeurs de N proposées par l'ajustement du signal du haut et celui du signal du bas inférieurs à 50%. En revanche, seuls 9 ont des écarts inférieurs à 10%. Étant donné le niveau de bruit, la dérive progressive du capteur du haut et donc l'incertitude sur les valeurs de champ mesuré, cette large incertitude sur la valeur de N est cohérente. Ceci devrait s'améliorer significativement avec la diminution du niveau de bruit et l'amélioration de la stabilité des capteurs. La moyenne des valeurs de N proposées pour les signaux correctement corrélés est de 47 billes (± 20). Ceci est aussi cohérent avec la détectivité des deux capteurs lors de ces expériences. D'autre part, cela explique également probablement que les seuls signaux ajustables détectés par les deux capteurs simultanément soient dans les échantillons les plus concentrés en cellules : des objets ayant plus de 20 billes sont très probablement (voir §5.2.3) des cellules labélisées.

Quelques exemples de signaux dont le traitement a été incorrect sont présentés Fig. 6.6. Ils appartiennent à deux catégories : soit l'un des signaux est faux (il provient du bruit), soit les deux signaux sont vrais et effectivement corrélés mais l'ajustement proposé est incorrect (à cause d'une déformation de l'un des deux signaux par le bruit ou la superposition d'autres événements).

Le verrou principal à lever est l'amélioration des performances des capteurs sur verre. Nous avons envisagé différentes hypothèses avant de constater sur un échantillon démonté (Fig. 6.7) que les yokes et les contacts des capteurs du haut étaient rongés au niveau du canal, et nulle part ailleurs. D'autre part, les capteurs du bas de ce même échantillon n'avaient pas été rongés. Ainsi, il semble que la dégradation des capteurs du haut soit due à leur passivation insuffisante. Leur oxydation est alors probablement causée par une combinaison des facteurs NOA, agent oxydant (oxygène ou eau) et courant (aggravant la réaction). La solution est donc de modifier le protocole de montage du capteur deux étages en remplaçant le NOA par de la SU-8. Un nouveau dispositif a pu être monté ainsi. Le nouveau protocole est donné en Annexe M. Les prochains tests devraient permettre de valider ce protocole.

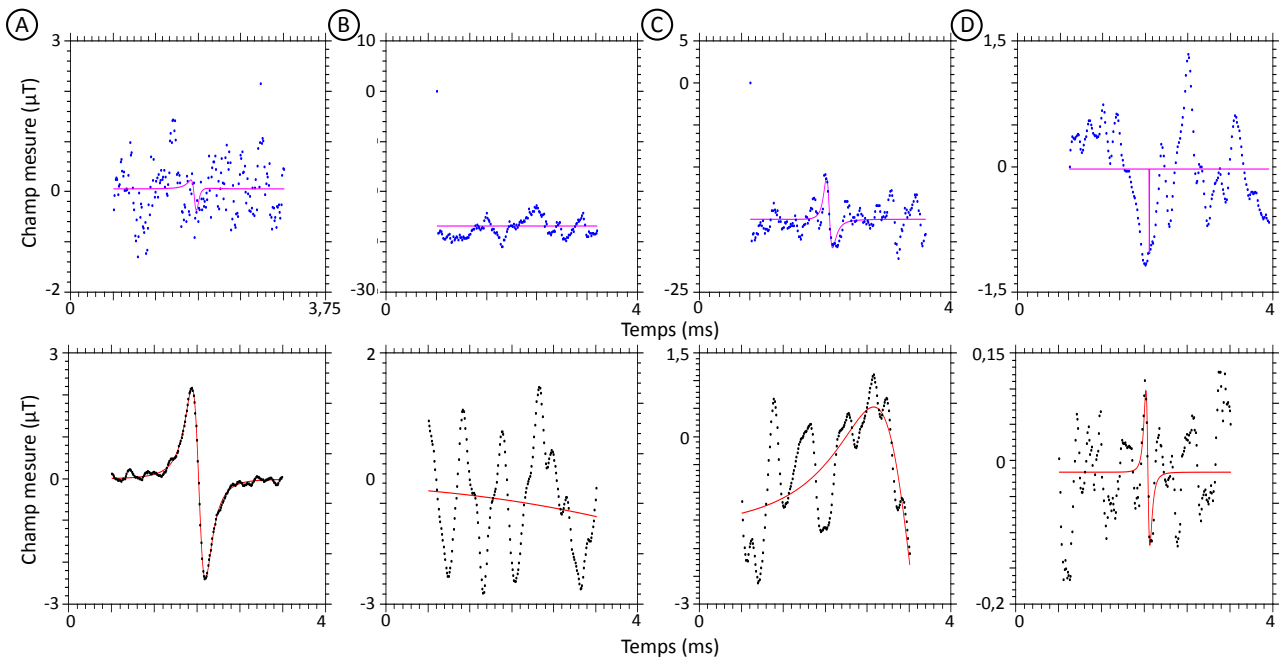


FIGURE 6.6 – Exemples de corrélations fausses des signaux réels lors de l’expérience sur les billes seules. Les signaux enregistrés par le capteur du haut sont en haut de la figure tandis que les signaux enregistrés par le capteur du bas sont en bas. Les signaux expérimentaux sont représentés par les points et les ajustements sont représentés par une ligne continue. A) Le signal reconnu pour le capteur du haut est indiscernable dans le bruit dont le niveau a augmenté transitoirement pendant une certaine période lors de l’expérience. B) Le signal reconnu pour le capteur du haut est composé de bruit télégraphique, le signal n’est donc pas ajusté. Le signal du capteur du bas est composé de plusieurs signaux et l’ajustement proposé ne convient pas. C) Le signal reconnu pour le capteur du haut est composé de bruit télégraphique, mais le programme est parvenu à ajuster correctement un signal qui a une amplitude suffisamment grande pour dépasser du bruit. Le signal du capteur du bas est composé de plusieurs signaux et l’ajustement proposé ne convient pas. D) Le signal reconnu pour le capteur du haut est en fait composé de plusieurs signaux. Le signal reconnu pour le capteur du bas est noyé dans le bruit. Les ajustements proposés ne conviennent pas.

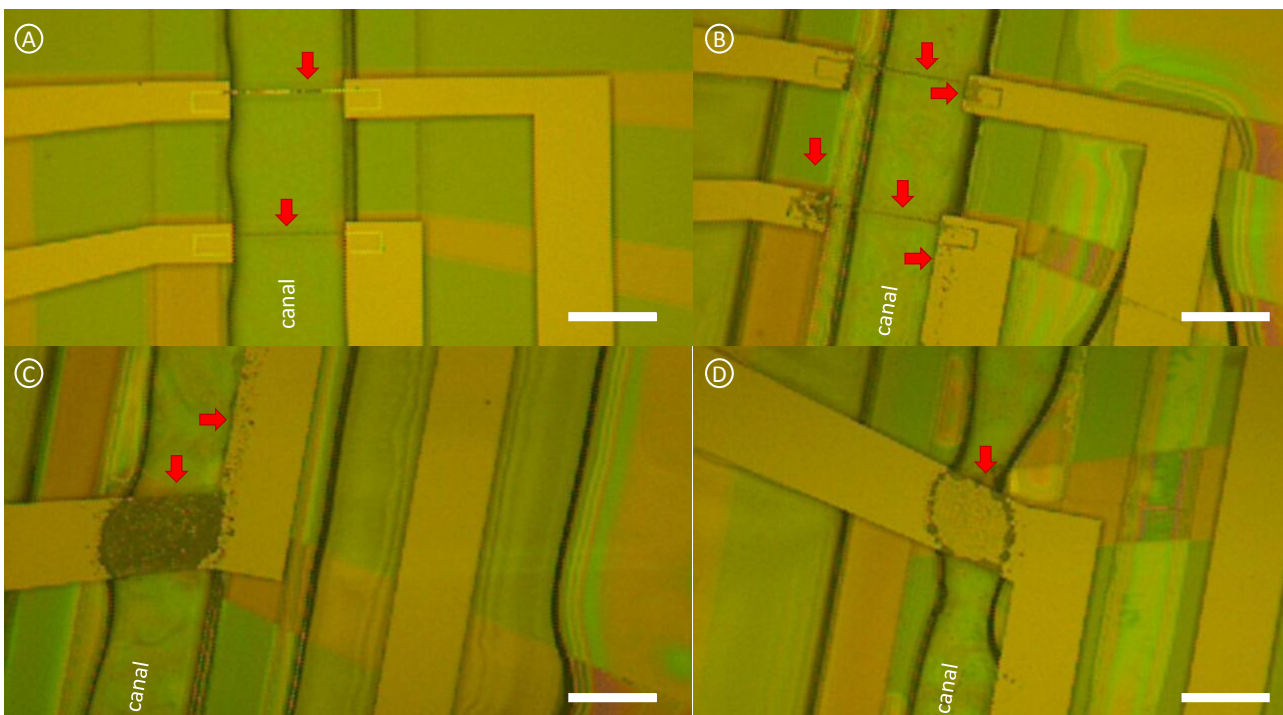


FIGURE 6.7 – Photographies des zones rongées sur le dispositif du haut après utilisation de la puce. Les zones rongées sont indiquées par des flèches rouges. La barre d’échelle mesure 100 µm. A) et B) montrent la dégradation obtenue au niveau des capteurs. C) et D) montrent des dégradations survenues sur les contacts, toujours au niveau du canal.

L'autre aspect expérimental à modifier est l'effet de tourbillon final qu'il faut supprimer afin de limiter la superposition de plusieurs évènements. Cela peut être réalisé en cassant le flux avec un pilier central dans le réservoir, de façon analogue à ce qu'on peut trouver pour les entonnoirs à grain, et devrait améliorer le taux de signaux doublement détectés ajustables.

Enfin, le traitement des données doit également être amélioré. Le programme actuel trie indépendamment les signaux de chaque voie dans un premier temps. Il va pouvoir être changé pour un programme qui cherche immédiatement des corrélations sur les deux voies. D'autre part, les six paramètres de ce programme doivent être optimisés, ce qui va nécessiter une étude complète, à réaliser sur plusieurs expériences.

6.5 Discussion

Le dispositif deux étages a été très complexe à monter. Le protocole de fabrication mérite de nouveaux ajustements afin de le faciliter et d'améliorer sa robustesse. De plus, la hauteur précise du canal doit être caractérisée au micron près. L'utilisation d'un profilomètre optique devrait nous permettre de connaître l'épaisseur effective de colle séparant la série de capteurs du haut du canal.

Il est aussi nécessaire de travailler sur la suppression de l'effet de tourbillon. En effet, cette méthode est très fortement impactée par la détection de plusieurs signaux en simultané car les signaux détectés à la fois en haut et en bas ne sont alors plus attribuables à un objet mais à un mélange, dont l'ajustement et la reconnaissance est bien plus complexe.

Enfin, l'algorithme de traitements des données doit être mis au point. Il a permis de vérifier que la détection avec ce nouveau dispositif « deux étages » devrait permettre d'améliorer la spécificité et la sensibilité d'un test de diagnostic à base de capteurs GMR. Il y a cependant encore beaucoup de travail pour optimiser les 6 paramètres (valeurs de filtre, seuil d'amplitude, délai de coïncidences) qu'il utilise et qui ont pour l'instant été fixés arbitrairement.

Ces premières expériences ont ainsi permis d'identifier les verrous à lever pour avancer dans le projet du capteur deux étages. La preuve de concept d'une détection simultanée des objets a été réalisée. Le prochain test, avec un dispositif « tout SU-8 », devrait permettre d'effectuer des mesures plus fiables.

Conclusion

Le développement d'outils de diagnostic qui répondent aux critères ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid/Robust, Equipment-free, Deliverable to end-users) définis par l'Organisation Mondiale pour la Santé [15], est un vrai défi dans les domaines de la santé, de l'environnement et de la défense.

Au cours de cette thèse, j'ai développé, optimisé et caractérisé un outil capable de compter spécifiquement des cellules eucaryotes une à une sur le modèle de la lignée cellulaire NS1 (myélome murin). Son fonctionnement est basé sur l'utilisation de microparticules magnétiques commerciales fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux, dirigés contre les objets biologiques cibles. La détection dynamique de ces derniers, après interaction avec les billes magnétiques, est réalisée grâce à des capteurs à magnétorésistance géante (capteurs GMR) développés au SPEC/LNO. Deux dispositifs (appelés « un étage » et « deux étages ») reposant sur ce principe ont été mis au point et testés. Un gros travail de simulations a permis de maîtriser un grand nombre de paramètres intervenant dans cette étude. La géométrie des capteurs, la mise au point des deux dispositifs mais aussi le choix des billes ont ainsi pu être optimisés grâce à ces calculs.

Le capteur un étage est le plus facile à concevoir. Il comporte un canal microfluidique séparé des capteurs GMR par une couche inerte de quelques micromètres afin de s'affranchir de signaux non spécifiques, essentiellement liés à la présence d'agrégats de billes, et de limiter ainsi les faux positifs. C'est avec ce dispositif qu'ont été obtenus la majorité des résultats exposés dans cette thèse. Ainsi, grâce à un protocole strict d'échantillons à tester, mis en place pour chaque expérience, tous les critères qui définissent un test de diagnostic (la sensibilité, la spécificité et la robustesse, mais aussi la rapidité et la facilité d'utilisation) ont pu être évalués pour ce dispositif. Il a été mis en évidence que les capteurs GMR permettent la détection des objets biologiques un par un mais que la sensibilité obtenue n'est pas à la hauteur de cette détection à cause de la présence de nombreux faux positifs. Nous avons pu estimer une limite de sensibilité sur notre modèle biologique autour d'une concentration d'environ 10^4 cellules NS1/mL. La plupart des tests ont été réalisées en PBS mais deux tests fructueux, qui devront être répétés, ont été effectués avec du milieu de culture et du plasma de lapin dilué (80%). Le test complet s'effectue en 2h30 (2h de labélisation des cellules par les billes puis 30 minutes de passage dans la puce pour 1 mL de solution).

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant d'autres méthodes comme les tests bandelette, ELISA et la cytométrie en flux avec ce même modèle biologique. Les cellules n'ont pas migré dans la nitrocellulose et le test bandelette n'a donc pas fonctionné. En PBS, le test ELISA a les mêmes performances que notre test à base de capteurs GMR mais a une sensibilité dix fois meilleure en plasma de lapin. Il est cependant important de mentionner que, contrairement au test ELISA « classique » qui détecte une concentration de cibles et est donc par nature limité aussi bien dans les hautes que les basses concentrations, notre dispositif a l'énorme potentiel de pouvoir détecter les objets biologiques un par un. Enfin, la cytométrie en flux a permis un comptage des cellules jusqu'à une concentration limite d'environ $3 \cdot 10^3$ cellules/mL. Ainsi, l'ELISA comme la cytométrie ont pour l'instant une meilleure sensibilité que celle de notre test mais elles requièrent du matériel de laboratoire, (robots laveurs et spectrophotomètre pour l'ELISA, centrifugeuse, et cytomètre en flux pour la cytométrie) et la manipulation par du personnel qualifié. D'autre part, le nombre d'évènement comptés par la cytométrie en flux et le test GMR sont similaires pour les échantillons ayant plus de $3 \cdot 10^3$ cellules/mL, la différence de sensibilité s'expliquant par un plus grand nombre de faux positifs avec notre méthode.

Afin d'augmenter la sensibilité de notre test, il est donc nécessaire de limiter le nombre de ces signaux non spécifiques qui proviennent des agrégats. Des solutions ont été mises en œuvre pour lever ce verrou.

La première consiste à utiliser le capteur deux étages. Il permet de détecter simultanément un même objet avec deux capteurs placés en haut et en bas du canal. Le moment de chacun des objets doublement détectés et par conséquent sa nature (bille, agrégats, objets biologiques) peut ainsi être déterminé avec une incertitude qui reste à définir. Elle doit décroître avec la taille moyenne des agrégats en suspension. Cette discrimination selon le moment magnétique devrait permettre d'améliorer la spécificité et la sensibilité. Au cours de cette thèse, nous avons essentiellement mis au point la fabrication de ce dispositif qui est bien plus complexe que celle du capteur un étage. Plusieurs problèmes doivent encore être réglés (optimisation des performances des capteurs GMR sur verre, électronique, traitement des signaux etc.). Malgré les difficultés rencontrées avec ce nouveau dispositif, des premières mesures ont pu être réalisées. L'analyse des résultats est complexe et à ce jour incomplète mais nous avons cependant déjà pu corrélérer certains signaux deux à deux et en déduire des informations sur les objets correspondants.

L'autre solution (à mener en parallèle) pour diminuer le nombre de signaux faux-positifs, consiste à réduire le nombre d'agrégats dans la solution testée. Plusieurs pistes sont envisageables pour y parvenir. Certaines méthodes consistent à séparer les amas formés des billes seules en les discriminant selon leur taille ou leur moment magnétique [112–114], mais il s'agit d'une solution coûteuse puisqu'elle élimine une proportion importante des particules fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux. Nous avons donc choisi une autre solution qui consiste à préparer des marqueurs stables en solution physiologique et en matrice biologique complexe (sang, plasma, urine etc.). Ceci demande cependant une bonne maîtrise des différents paramètres pertinents que sont la taille des particules, le matériau de surface, la charge de surface, et la structure de surface (forme, porosité, présence de longues chaînes de polymères en peigne ...) [35, 115, 116]. Une collaboration a été mise en place avec une équipe de chimistes spécialistes de la synthèse de nanoparticules magnétiques stables en suspension colloïdale qui possède une grande expérience dans les applications biomédicales⁶. L'idée est de remplacer les billes commerciales utilisées jusqu'à présent par des billes de taille nanométrique, spécialement conçues pour ce projet, ayant une forte stabilité colloïdale et diffusant plus vite en solution afin de réduire le nombre d'agrégats et la durée du test.

Par la suite, le changement de modèle biologique pour des spores ou des bactéries végétatives devrait permettre une utilisation concrète en tant qu'outil de diagnostic. Grâce à la versatilité du principe de détection dynamique avec des capteurs GMR, ce changement de cible ne devrait modifier finalement que peu le dispositif (taille du canal réduite). Ces objets sont en effet 10 fois plus petits que les cellules avec lesquelles nous avons développé notre outil jusqu'à présent. En outre, le rapprochement entre les cibles et les capteurs disposés de part et d'autre du canal devrait améliorer grandement les performances du test en augmentant à la fois le pourcentage d'objets détectables et la précision de la détection.

A plus long terme, le système doit être automatisé et allégé pour simplifier son utilisation et le rendre transportable. Une première étape sera de remplacer notre montage de champ homogène par un aimant permanent homogène et la chambre bas-bruit dans laquelle sont faites les mesures par l'utilisation d'un capteur de référence en dehors du canal, comme cela a été fait par d'autres groupes [82, 117]. L'automatisation du traitement du signal et son implémentation dans un microcontrôleur, (notamment pour la corrélation des multiples voies d'acquisition faite actuellement en post-traitement) simplifiera également le système. Ce travail a été initié au sein du Service de Physique de l'Etat Condensé⁷.

Enfin, les contraintes liées au risque biologique doivent être prises en compte en modifiant le dispositif et la chaîne d'acquisition pour rendre certaines parties de cet outil stérilisables, et d'autres, en contact direct avec les échantillons, jetables. Un premier objectif moyen terme sera d'effectuer les expériences en conditions de risque biologique niveau 2, au sein du LERI.

6. Le laboratoire PHysico-chimie des Electrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux (PHENIX).

7. Le Laboratoire d'Electronique et de Traitement du Signal développe actuellement ces appareils et programmes.

Annexes

Annexe A : Protocoles de Micromod adaptés pour la fonctionnalisation des billes de 50 nm

www.micromod.de

TECHNOTE 102

Purification of Nanoparticles by Size Exclusion Chromatography (SEC)



micromod Partikeltechnologie GmbH

Friedrich-Barnewitz-Str. 4
D-18119 Rostock
Germany

Telephone: + 49 381 / 54 34 56 10
Fax: + 49 381 / 54 34 56 20
E-mail address: info@micromod.de

Introduction

Micromod's nanoparticles are most frequently supplied in aqueous suspension without any surfactants. Our protein-coated particles come in PBS buffer and sodium azide as antimicrobial agent.

All our magnetic, fluorescent and white nanoparticles with diameters < 130 nm can easily be purified from small molecules or salts with molecular weights < 1000 Da or transferred into special buffers by size exclusion chromatography (SEC). This purification method allows a quick removal of excess of reagents after activation or functionalization of chemical groups on the particle surface. SEC is an adjuvant alternative to ultracentrifugation, that prevents sonication to resuspend the pellet, especially if sensitive biomolecules are present in the system.

Handling Instructions

Desalting columns, that are based on gel filtration technique are available from different commercial suppliers. We recommend the use of desalting columns with an exclusion limit of 5.000 Da, e.g. PD-10 desalting columns for the purification of sample volumes up to 2.5 ml, PD Minitrap[®] G-25 columns for volumes up to 1 ml or PD Minitrap[®] G-25 columns for volumes up to 0.5 ml (all from GE Healthcare).

The columns can be used according to manufactures guidelines. Thereby the gravity protocol is favoured over the spin protocol. The equilibration of the desalting column with your buffer of choice is essential to remove any stabilizers, that are used in column packing. The particle suspension has to be diluted to the sample volume, that is required for the special column type (e.g. 2.5 ml for PD-10 desalting columns). The solid concentration of the particle suspension should not exceed 35 mg/ml to prevent any overloading of the column. The particle suspension should enter the packed bed of the column completely. The flow-through is discarded. Then the purified particles are eluted with the elution buffer into a test tube, that is placed under the column (e.g. 3.5 ml elution buffer for PD-10 desalting columns). By using the gravity protocol the particle suspension becomes diluted. The recovery of the applied particles is usually in the range of 80-95%.

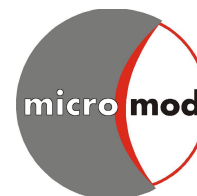
Annexe B : Fiche produit des billes Micro50

www.micromod.de

Technical Data Sheet

Revision Date 29.07.2016 Version 2.4

TECHNICAL DATA SHEET



micromod Partikeltechnologie GmbH

Friedrich-Barnewitz-Str. 4
D-18119 Rostock
Germany

Telephone: + 49 381 / 54 34 56 10
Fax: + 49 381 / 54 34 56 20
E-mail address: info@micromod.de

Product code:	79-19-501
Product name:	nanomag®-D-spio
Surface:	streptavidin
Size:	50 nm
Solid content:	5 mg/ml
Composition:	dextran iron oxide composite particles
Polydispersity index:	< 0.2
Shape:	cluster-typed
Density:	1.4 g/ccm
Iron concentration:	2.4 mg/ml
Magnetization:	56 emu/g iron (H =1000 Oe)
Saturation magnetization:	>69 emu/g iron (H > 10.000 Oe)
Coercive field Hc:	0.077 kA/m
Stable in:	aqueous buffers pH > 4
Not stable in:	organic solvents, acidic solutions pH < 4
Product form:	Suspension in PBS (0.02 % sodium azide)
Particles per ml:	5.5*E13
Particles per mg:	1.1*E13
Protein binding capacity:	1.5 µg streptavidin / mg particle (ca. 1-2 molecules streptavidin per particle)
Colour:	dark brown
Additional remarks:	Storage at 2 - 8 °C for 3 months.
TECHNOTES:	The mean hydrodynamic particle diameter may vary in the range of 50-120 nm (Z-Average, photon correlation spectroscopy).

Annexe C : Fiche produit des billes Chemi50

chemicell

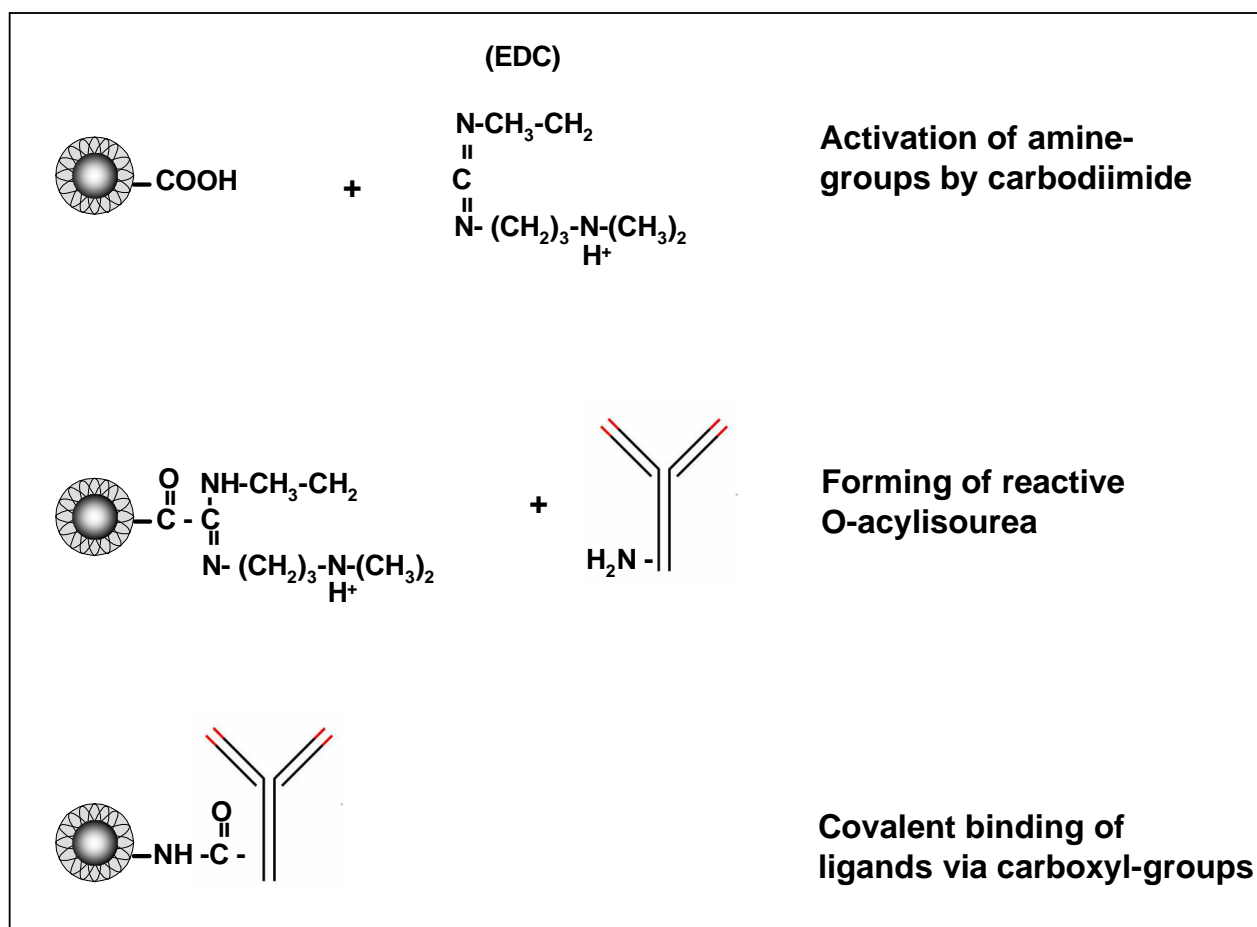
Protocol A10

Covalent Coupling Procedure on fluidMAG-ARA by Carbodiimide Method

Introduction:

The coupling procedure with carbodiimides are a binary covalent binding system and guarantee therefore a good reproducibility of the immobilization.

Carbodiimides react with the carboxylate groups from the magnetic beads to highly reactive O-acylisourea derivatives and react readily with amine-groups of the ligands.



Equipment and reagents:

- **fluidMAG-ARA**
- **Wash & Coupling Buffer:**
0.1 M 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 5.0
- **Water soluble carbodiimide:**
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)
or
1-cyclohexyl-3(2- morpholinoethyl) carbodiimide metho-p toluensulfonate (CMC)
- **Blocking & Storage Buffer:** PBS, 0.1 % BSA, 0.05 % sodium azide
- **Magnetic Separator (e.g. MagnetoPURE, Product Number: MP-10)**

Technical Note:

- We recommended for high molecular ligands, such as antibodies or proteins, the 2-step method for the prevent of cross linking effects. The 1-step method without washing after the EDC addition (3.) is more effective for the coupling of low molecular ligands.
- For antibodies or proteins we recommend to use a minimum amount of 50 µg antibody/protein per 10 mg **fluidMAG-ARA**. In general, the higher the amount of antibody/protein per milligram of **fluidMAG-ARA**, the higher will be the degree of magnetic particle surface coating with the protein.

Prepare the EDC solution immediately before use and mix the volume rapidly into the reaction tube.

This following protocol describes a coupling of biomolecules on 10 mg particles. This procedure can be scaled up by adjusting volumes of required reagents.

Protocol:

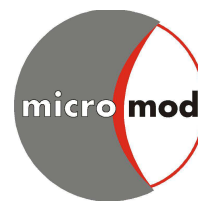
1. Wash the **fluidMAG-ARA** particles 2 x with 1 ml MES buffer by using of the magnetic separator.
2. After the second wash step resuspend the magnetic particles in 0.25 ml MES buffer.
3. Dissolve 10 mg EDC or CMC in 0.25 ml MES buffer. Add **freshly prepared EDC** to the particles and mix gently for 10 minutes at room temperatur.

2-step methode

4. After incubation wash the particles 2 x with 1 ml MES buffer and resuspend the activated particles in 0.25 ml MES buffer.

1-step and 2-step procedure

5. Add proteins (e.g. 50 µg protein dissolved in MES buffer) to the activated particles and mix the suspension gently for two hours at room temperatur.
6. Wash the particles 3 x with 1 ml PBS.
7. Resuspend the particles in Blocking/Storage buffer.



TECHNOTE 200

Binding of Biomolecules on the Surface of Carboxylated Particles by Carbodiimide Chemistry

micromod Partikeltechnologie GmbH

Friedrich-Barnewitz-Str. 4
D-18119 Rostock
Germany

Telephone: + 49 381 / 54 34 56 10
Fax: + 49 381 / 54 34 56 20
E-mail address: info@micromod.de

Introduction

An easy and rapid conjugation method of biomolecules to particle surfaces is based on the carbodiimide / N-hydroxysuccinimide activation of the carboxylic acid groups on particle surfaces followed by reaction with amino groups of the biomolecule [1]-[6]:



This method leads to a random amide bond formation between particle surface and biomolecule, and is limited regarding the oriented binding of molecules, like antibodies, on the particle surface [7].

Protocol

The protocol is given for the coating of a fixed amount of 25 mg of particles with a special protein or antibody. It can be varied in the scale according to your individual requirements.

Material:

- particle suspension (surface: COOH or PEG-COOH) containing 25 mg of particles,
- 0.5 M MES buffer (2-(4-morpholino)ethanesulphonic acid buffer), which was adjusted to pH 6.3 with 2.5 M Na₂CO₃,
- 4 mg EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride),
- 8 mg NHS (N-hydroxysuccinimide),
- 150 – 200 µg protein or antibody,
- 0.01 M PBS buffer (pH = 7.4),
- 200 µl of 25 mM glycine in 0.01 M PBS buffer.

Procedure:

- transfer the particle suspension into a 2 ml reaction tube,
- dissolve 4 mg EDC and 8 mg NHS in 0.5 M MES-buffer (pH = 6.3). The buffer volume should be a quarter of the initial volume of the particle suspension.
- incubate the suspension with continuous shaking for 45 min at room temperature,
- wash the activated particles by centrifugation (Technote 100), magnetic separation (Technote 101) or size exclusion chromatography (Technote 102) with 0.01 M PBS buffer (pH=7.4),
- add 0.01 M PBS buffer (pH = 7.4) containing 150 – 200 µg protein or antibody,
- incubate the suspension with continuous mixing for 3 hours at room temperature,

- wash the particles by centrifugation (Technote 100), magnetic separation (Technote 101) or size exclusion chromatography (Technote 102) with 0.01 M PBS buffer (pH=7.4),
- add 200 µl of 25 mM glycine in 0.01 M PBS buffer,
- incubate the suspension with continuous mixing for 30 min at room temperature,
- wash the particles three times by centrifugation (Technote 100), magnetic separation (Technote 101), size exclusion chromatography (Technote 102) or dialysis (Technote 103) with 0.01 M PBS buffer (pH=7.4),
- resuspend the particles in 1 ml PBS-buffer (pH = 7.4),
- stabilize the suspension by addition of 20 µl 1% sodium azide solution if necessary.

Note:

This protocol is intended to provide general guidelines for the binding of biomolecules or related compounds. Further optimization may be required in order to achieve optimal functionality and stability from case to case.

References

1. Delpont F., Deres A., Hotta J.-i., Pollet J. et al., Improved methods for counting DNA molecules on biofunctionalized nanoparticles. *Langmuir* **2010**, 26:1594-1597.
2. Nair B. G., Nagaoka Y., Morimoto H., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar S. Aptamer conjugated magnetic nanoparticles as nanosurgeons. *Nanotechnology* **2010**, 21:455102 (455108pp).
3. Vigor K. L., Kyrtatos P. G. , Minogue S., Al-Jamal K. T., Kogelberg H., Tolner B., Kostarelos K., Begent R. H., Pankhurst Q. A., Lythgoe M. F., Chester K. A., Nanoparticles functionalised with recombinant single chain Fv antibody fragments (scFv) for the magnetic resonance imaging of cancer cells. *Biomaterials* **2010**, 31:1307-1315.
4. Shamsipour F., Zarnani A. H., Ghods R., Chamankhah M., Forouzesh F., Vafaei S., Bayat A. A., Akhondi M. M., Oghabian M. A., Jeddi-Tehrani M., Conjugation of Monoclonal Antibodies to Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Detection of her2/neu Antigen on Breast Cancer Cell Lines. *Avicenna J Med Biotech* **2009**, 1:27-31.
5. Tudorache M., Bala C., Sensitive aflatoxin B1 determination using a magnetic particles-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Sensors* **2008**, 8:7571-7580.
6. DeNardo S. J., DeNardo G. L., Natarajan A., Miers L. A., Foreman A. R., Grüttner C., Adamson G. N., Ivkov R., Thermal Dosimetry Predictive of Efficacy of ¹¹¹InChL6 Nanoparticle AMF-Induced Thermoablative Therapy for Human Breast Cancer in Mice. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48:437-444.
7. Grüttner C., Müller K., Teller J., Westphal F., Foreman A. R., Ivkov R., Synthesis and antibody conjugation of magnetic nanoparticles with improved specific power absorption rates for alternating magnetic field cancer therapy. *J. Magn. Magn. Mat.* **2007**, 311:181-186.

Annexe D : Fiche produit des billes Adem200

Carboxyl-Adembeads 0212

For research use only

PRODUCT DESCRIPTION

Carboxyl-Adembeads are monodispersed and super-paramagnetic beads composed of magnetic core encapsulated by a highly cross-linked hydrophilic polymer shell. The surface is activated with carboxylic acid functionality. The hydrophilic surface ensures low non-specific binding, excellent dispersion abilities and easy handling of the beads in a wide range of buffers. Carboxyl-Adembeads are produced under aseptic conditions and are sold in an aqueous suspension containing 0.09% NaN₃.

Physical characteristics

Diameter : 200 nm (CV max 20%)
 Density : approx. 2.0 g/cm³
 Magnetisation at saturation: approx. 40 emu/g
 Specific surface area : 15 m²/g
 Iron oxide content : approx. 70%
 COOH density : > 350 µmol/g
 Solid content : 30 mg/ml (3%)

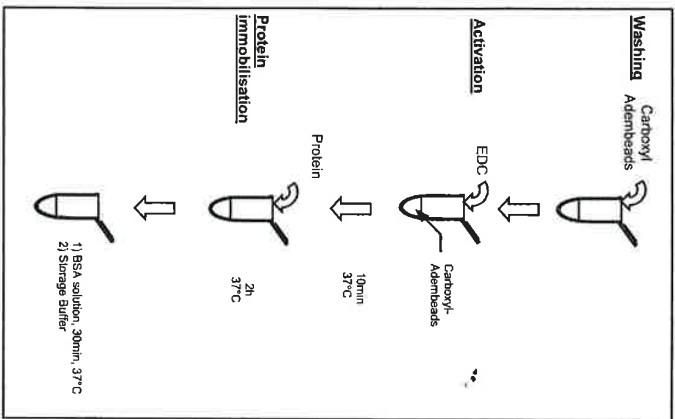
PRINCIPLE

Carboxyl-Adembeads are designed to act as solid support for a wide variety of biomagnetic separations and manipulations. Proteins, oligonucleotides or other target specific molecules can be easily covalently coupled directly onto the surface of Adembeads via primary amino groups. Once coupled with ligand, the beads can be added to a cell lysate or other suspensions containing your target molecule. After a short incubation, the beads can be pulled to the side of the test tube by use of a magnetic device allowing aspiration of unbound material. Furthermore, the magnet facilitates washing and concentration of the isolated target.

Version 2.5

PROTOCOL SUMMARY

The functional carboxylic acid groups of Carboxyl-Adembeads offer the possibility for many different immobilisation procedures for use with proteins or other ligands via EDC activation for example.



INSTRUCTION FOR USE

The functional carboxylic acid groups of Carboxyl-Adembeads offer the possibility for many different immobilisation procedures for use with proteins or other ligands via EDC activation for example. We recommend coupling 10-50 µg of ligand per mg beads. Protocols should be optimised to meet your requirements (e.g. sample volume, concentration of ligand / beads/ EDC).

Calculation:
 1mg beads = 33.33µl.

A) Before starting

Dilute Activation Buffer (10X) and Storage Buffer (10X) 10 fold in distilled water.

B) Washing procedure for Carboxyl-Adembeads

1. Resuspend the Carboxyl-Adembeads (3%) by pipetting and vortexing. Avoid foaming.
2. Pipette the volume to be used into the desired test tube and complete to obtain a solution at 1% with the Activation Buffer (1X, diluted in distilled water) of choice according to the preferred conjugation method.
3. Place the tube in a magnet (see Related Product) for 1min.
4. Pipette off the supernatant carefully, leaving beads undisturbed.
5. Remove the test tube from the magnet (see Related Product) and resuspend the beads carefully in the Activation Buffer (1X, diluted in distilled water) to obtain a solution at 1%. Mix well for 1min.
6. Repeat steps 3-5.

C) Coating procedure using EDC activation

The Carboxyl-Adembeads can be activated with EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, MW 191.7) that reacts with the carboxylic acid groups to form an amine-reactive intermediate.

Activation step:

1. Wash the Carboxyl-Adembeads with Activation Buffer (1X, diluted in distilled water) as described below.
2. Prepare a 4mg/ml EDC solution in Activation Buffer (1X, diluted in distilled water) and add 80µl of EDC solution per mg of beads; Vortex to mix properly.
3. Incubate for 10 min at 37°C under shaking. The beads are now activated and ready for coating with a ligand.

Note: Depending on the ligand, protocol can be customised (incubation time / concentration of EDC).

Protein immobilisation:

1. Add 10-50µg of proteins per mg of activated particles.

Note: For best results, we recommend working with protein solution at 1-2 mg/ml. Dilute protein solution in Activation Buffer (1X) is possible. The protein solution must be free of primary amines (e.g. Tris buffer) and others proteins.

2. Incubate for 2h at 37°C under shaking.
 3. Prepare the Bovine Serum Albumine (BSA) solution in Activation Buffer (0.5mg/ml) and add 200µl of BSA solution to 100µl of Protein-coated beads; Vortex to mix properly.
- Note:** Depending on the ligand, protocol can be customised (ethanolamine / Tris...).
4. Incubate for 30min at 37°C under shaking.
 5. Wash the beads with the Storage Buffer (1X, diluted in distilled water) twice and resuspend the beads at the desired concentration.

ADDITIONAL MATERIAL REQUIRED

- Magnetic device
 - Rotation device
 - Test tubes
 - Related products: Buffers solutions
 - Activation Buffer (# 10101)
 - Storage Buffer (# 10201)
- Magnetic Devices
- Adem-Mag SV, 1.5 ml (# 20101)
 - Adem-Mag MV, 15 ml (# 20102)
 - Adem-Mag HV, 50 ml (# 20103)
 - Adem-Mag MSY, 12x1.5 ml (# 20104)

STORAGE/STABILITY

When stored in unopened vials at 2-8°C, Carboxyl-Adembeads are stable until expiration date printed on the label. The Carboxyl-Adembeads must be maintained in liquid during storage and all handling steps. Drying will result in reduced performance. Do not freeze the product.

PRECAUTIONS

Annexe E : Fiche produit des billes Micro500

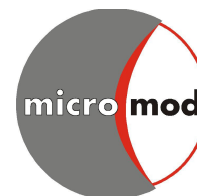
www.micromod.de

Technical Data Sheet

Revision Date 02.01.2017 Version 3.01

TECHNICAL DATA SHEET

micromod Partikeltechnologie GmbH



Friedrich-Barnewitz-Str. 4
D-18119 Rostock
Germany

Telephone: + 49 381 / 54 34 56 10
Fax: + 49 381 / 54 34 56 20
E-mail address: info@micromod.de

Product code:	09-19-502
Product name:	nanomag®-D
Surface:	streptavidin
Size:	500 nm
Solid content:	10 mg/ml
Composition:	dextran iron oxide composite particles
Polydispersity index:	< 0.2
Shape:	cluster-typed
Density:	3.0 g/ccm
Magnetization:	47 Am ² /kg iron (H = 80 kA/m)
Saturation magnetization:	>70 Am ² /kg iron (H > 800 kA/m)
Coercive field H_c:	0.677 kA/m
Stable in:	aqueous buffers pH > 4
Not stable in:	organic solvents, acidic solutions pH < 4
Product form:	Suspension in PBS (0.02 % sodium azide)
Particles per ml:	5.1 E10
Particles per mg:	5.1 E9
Protein binding capacity:	1.5 - 2.0 µg streptavidin / mg particle
Colour:	dark brown
Additional remarks:	Storage at 2 - 8 °C for 3 months.

Annexe F : Fiche produit des billes Dyna1

invitrogen

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1

Catalog Nos. 65601, 65602, 65604D

Store at 2°C to 8°C

Publication No. MAN0015761

Rev. B.0

Kit contents

Cat. No.	Volume
65601	2 mL
65602	10 mL
65604D	50 mL

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 beads contain 10 mg/mL of magnetic beads (~7–10 × 10⁹ beads/mL) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 with 0.1% bovine serum albumin (BSA), and 0.02% sodium azide as a preservative.

Product description

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads are ideal for numerous applications, including purification of proteins and nucleic acids, protein interaction studies, immunoprecipitation, immuno-assays, phage display, biopanning, drug screening and cell isolation.

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads have increased binding capacity and lower sedimentation rate compared to standard Dynabeads™ magnetic bead, making them ideal for automated applications, and for isolating larger amounts of biotinylated ligand (e.g., oligonucleotides or peptides) or their specific targets.

Required materials

- DynaMag™ Magnet (See thermofisher.com/magnets for recommendations on magnets appropriate for manual or automated protocols)
- Sample mixer allowing tilting and rotation of tubes (e.g. HulaMixer™ Sample Mixer)
- Buffers and solutions (see Table 1)
- For biotinylation details, see the Molecular Probes Handbook at thermofisher.com/handbook

General guidelines

- Use a mixer to tilt/rotate the tubes so Dynabeads™ magnetic beads do not settle at the tube bottom.
- Avoid air bubbles during pipetting.
- Keep the tube on the magnet for up to 2 minutes to ensure that all the beads are collected on the tube wall.
- If it is not necessary to remove preservatives or change buffers, you can omit washing the Dynabeads™ magnetic beads.
- For dilute samples, increase the incubation time or divide the sample into several smaller aliquots.
- Indirect target capture is recommended if molecule-target kinetics are slow, affinity is weak, molecule concentration is low, or molecule-target binding requires optimal molecule orientation and true liquid-phase kinetics. Perform indirect capture by mixing a biotinylated molecule with the sample to capture the molecule target before adding Dynabeads™ magnetic beads.
- Free biotin in the sample reduces the binding capacity of the beads.
 - For antibodies/proteins, remove unincorporated biotin using a disposable separation column or a spin column.
 - For nucleic acids, perform PCR with limiting concentrations of biotinylated primer, or remove free biotinylated primer by ultrafiltration, microdialysis, or other clean-up protocols (PCR clean-up products are available from thermofisher.com).
- Optimize the quantity of beads used for each individual application by titration.
- Use up to two-fold excess of the binding capacity of the biotinylated molecule to saturate streptavidin.

Table 1 Recommended buffers and solutions

For coupling of nucleic acids	For RNA applications	For coupling of proteins and other molecules
Binding and Washing (B&W) Buffer (2X): 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM EDTA 2 M NaCl	Solution A: DEPC-treated 0.1 M NaOH DEPC-treated 0.05 M NaCl Solution B: DEPC-treated 0.1 M NaCl	PBS buffer pH 7.4 Additional buffers (if needed): PBS/BSA (PBS, pH 7.4 containing 0.01% [w/v] BSA) PBST (PBS pH 7.4 containing 0.01% [v/v] Tween™ 20)

The salt concentration and pH (typically 5–9) of the chosen binding/washing buffers can be varied depending on the type of molecule to be immobilized. Beads with immobilized molecules are stable in common buffers.

For many applications, adding a detergent, such as 0.01–0.1% Tween™ 20 to the washing/binding buffers reduces non-specific binding.

- Binding efficiency can be determined by comparing molecule concentration before and after coupling.

Both the size of the molecule to be immobilized and the biotinylation procedure will affect the binding capacity. The capacity for biotinylated molecules depends on steric availability and charge interaction between bead and molecule and between molecules. There are two or three biotin binding sites available for each streptavidin molecule on the surface of the bead after immobilization.

Protocol

Recommended washing buffers

Application	Washing Buffer	Notes
Nucleic acid	1X B&W Buffer	Dilute 2X B&W Buffer (see Table 1 for recipe) with an equal volume of distilled water.
Antibody/protein	PBS, pH 7.4	

Wash Dynabeads™ MyOne™ magnetic beads

Calculate the amount of magnetic beads required based on their binding capacity (see Table 2), and transfer the magnetic beads to a new tube.

- Resuspend the Dynabeads™ magnetic beads in the vial (i.e., vortex for >30 sec, or tilt and rotate for 5 min).
- Transfer the desired volume of Dynabeads™ magnetic beads to a tube.
- Add an equal volume (or at least 1 mL) of Washing Buffer and resuspend.
- Place the tube on a magnet for 1 min and discard the supernatant.
- Remove the tube from the magnet and resuspend the washed magnetic beads in a volume of Washing Buffer equal to the initial volume of Dynabeads™ magnetic beads taken from the vial (step 2).
- Repeat steps 4–5 twice, for a total of 3 washes.

Table 2 Typical binding capacity per mg (100 µL) of Dynabeads™ magnetic beads.

Biotinylated target	Binding/mg
Free Biotin (pmol)	1100–1700
Biotinylated peptides (pmol)	~400
Biotinylated antibody (µg)	~20
ds DNA (µg)*	~20
ss oligonucleotides (pmol)*	~400

* Oligonucleotides and DNA fragments

For oligonucleotides, capacity is inversely related to molecule size (number of bases). Reduced binding capacity for large DNA fragments may be due to steric hindrance.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Dynabeads™ MyOne™ magnetic beads for RNA applications

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 beads are not supplied in RNase-free solutions. Prepare the beads for RNA applications according to the following steps:

1. Wash the Dynabeads™ magnetic beads as directed in "Wash Dynabeads™ MyOne™ magnetic beads" (see page 1).
2. Wash the beads twice in Solution A for 2 min. Use a volume of Solution A equal to, or larger than the initial volume of Dynabeads™ magnetic beads originally taken from the vial.
3. Wash the beads once in Solution B. Use a volume of Solution B equal to the volume used for Solution A.
4. Resuspend the beads in Solution B.
5. Coat the beads with the biotinylated molecule of your choice.

Immobilization protocol

The following instructions describe a general protocol for immobilizing biotinylated molecules on the surface of Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads. For examples of immobilization protocols for specific applications, see "Immobilize nucleic acids" or "Immobilize antibodies/proteins".

1. Wash the Dynabeads™ magnetic beads as directed in "Wash Dynabeads™ MyOne™ magnetic beads" (see page 1).
2. Add the biotinylated molecule to the washed Dynabeads™ magnetic beads.
3. Incubate for 15–30 min at room temperature with gentle rotation of the tube.
4. Place the tube in a magnet for 2–3 min and discard the supernatant.
5. Wash the coated beads 3–4 times in washing buffer.
6. Resuspend to desired concentration in a suitable buffer for your downstream use.

Immobilize nucleic acids

1. Resuspend washed Dynabeads™ magnetic beads in 2X B&W Buffer to a final concentration of 5 µg/µL (twice original volume).
2. Add an equal volume of biotinylated DNA or RNA (in distilled water). Optimal binding occurs when the NaCl concentration is reduced from 2 M to 1 M.
3. Incubate for 15 min at room temperature using gentle rotation. Incubation time depends on nucleic acid length: short oligonucleotides (<30 bases) require a maximum of 10 min. DNA fragments up to 1 kb require 15 min.
4. Separate the biotinylated DNA or RNA coated beads with a magnet for 2–3 min.
5. Wash the coated beads 2–3 times with 1X B&W Buffer.
6. Resuspend to the desired concentration. Binding is now complete. Resuspend the beads with the immobilized nucleic acid fragment in a suitable buffer with low salt concentration for downstream applications.

Immobilize antibodies/proteins

1. Incubate the washed Dynabeads™ magnetic beads and biotinylated antibodies in PBS for 30 min at room temperature using gentle rotation.
2. Separate the antibody-coated beads with a magnet for 2–3 min.
3. Wash the coated beads 4–5 times in PBS containing 0.1% BSA.
4. Resuspend to the desired concentration for your application.

Release immobilized biotinylated molecules

The biotin-streptavidin bond is broken by harsh conditions.

- Incubate beads in 10 mM EDTA, pH 8.2 with 95% formamide at 65°C for 5 min, or 90°C for 2 min. >96% of immobilized biotinylated DNA is typically dissociated.
- Boil the beads for 5 min in 0.1% SDS to dissociate biotinylated proteins.
- It has been reported that a short incubation in non-ionic water at >70°C can break the biotin-streptavidin interaction.

Note: proteins are denatured by such treatments. Do not re-use Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads after releasing immobilized biotinylated molecules.

Automation

Magnetic separation and handling using Dynabeads™ magnetic beads can easily be automated on a wide variety of liquid handling platforms. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads share similar properties to Dynabeads™ M-280 Streptavidin but are smaller, making them ideal for automation applications due to their small size, low sedimentation rate, and high magnetic mobility. Selected protocols are available at thermofisher.com/automation.

Description of materials

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 magnetic beads are uniform, 1.0 µm dia. superparamagnetic beads with a streptavidin monolayer covalently coupled to the hydrophilic bead surface. This layer ensures negligible streptavidin leakage while the lack of excess adsorbed streptavidin ensures batch consistency and reproducibility of results.

Related products

Product	Cat. no.
Dynabeads™ M-280 Streptavidin	11205D
Dynabeads™ M-270 Streptavidin	65305
Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1	65001
Dynabeads™ Kit kilobaseBINDER™	60101*
DynaMag™-2 Magnet	12321D
HulaMixer™ Sample Mixer	15920D

* For biotinylated DNA fragments >2 kb.

REF on labels is the symbol for catalog number.

Important licensing information

These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Manufactured by Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, V.A. Graiciuno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania. Thermo Fisher Scientific Baltics UAB complies with Quality System Standards ISO 9001 and ISO 13485.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

Corporate entity: Life Technologies | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1.800.955.6288
©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Tween is a registered trademark of Croda Americas, PLC.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

For support visit thermofisher.com/support or email techsupport@lifetech.com

thermofisher.com

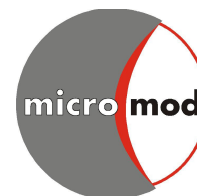
18 April 2017

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Annexe G : Fiche produit des billes Micro1.5www.micromod.de

Technical Data Sheet

Revision Date 02.01.2017 Version 3.01

TECHNICAL DATA SHEET**micromod Partikeltechnologie GmbH**

Friedrich-Barnewitz-Str. 4
D-18119 Rostock
Germany

Telephone: + 49 381 / 54 34 56 10
Fax: + 49 381 / 54 34 56 20
E-mail address: info@micromod.de

Product code:	39-19-153
Product name:	sicastar®-M
Surface:	streptavidin
Size:	1.5 µm
Solid content:	10 mg/ml
Composition:	magnetic silica particles
Shape:	spherical
Density:	2.5 g/ccm
Magnetization:	6.0 Am ² /kg particles (H = 80 kA/m)
Saturation magnetization:	> 8.0 Am ² /kg particles (H > 800 kA/m)
Stable in:	aqueous buffers pH > 4
Not stable in:	hydrofluoric acid, strong basic media, e.g. 6 M NaOH
Product form:	Suspension in PBS (0.02 % sodium azide)
Protein binding capacity:	1.4 - 1.6 µg streptavidin / mg particle
Colour:	dark brown
Additional remarks:	Storage at 2 - 8 °C for 3 months.

Annexe H : Fiche produit des billes Dyna2.8

invitrogen
by life technologies™

Dynabeads® M-280 Tosylactivated

Catalog nos. 14203, 14204

Store at 2°C to 8°C

Rev. Date: May 2012 (Rev. 010)

Product Contents

Cat. no	Volume
14203	2 mL
14204	10 mL

Dynabeads® M-280 Tosylactivated contains 30 mg beads/mL, supplied in purified water.

Product Description

Dynabeads® M-280 Tosylactivated are ideal for protein isolation due to their size and surface chemistry. Any ligand (e.g. antibody, protein, peptide or glycoprotein) containing amino or sulfhydryl groups can be covalently coupled to the bead surface. The beads are also suitable for separating cells and bacteria, as a solid phase in rapid immunoassays, for molecular applications or screening of phage display libraries. The efficacy of immunomagnetic separation is critically dependant on the specificity and avidity of the antibody or other protein ligand applied. A ligand protein with affinity for the specific target protein (e.g. markers, receptors, enzymes) can be coupled to the surface of Dynabeads® M-280 Tosylactivated.

The beads are added directly to the sample containing your target antibody/antigen. The beads bind to the target during a short incubation, and then the bead-bound target is separated by a magnet. Captured targets proteins may be eluted off the beads for further downstream analyses, or directly loaded on electrophoresis gels. The beads can be re-used several times after elution of the target protein, provided that the protein ligand is covalently coupled to the bead surface.

Required Materials

- Magnet (DynaMag™ portfolio). See www.lifetechnologies.com/magnets for recommendations.
- Mixer allowing tilting and rotation of tubes (e.g. HulaMixer® Sample Mixer).
- Primary antibody/ligand.

For research use only. Not for human or animal therapeutic or diagnostic use.

Buffers

See Table 1 for recommended buffers and solutions.

- Buffer A, B and C are used for pre-washing and coupling of Dynabeads® M-280 Tosylactivated. Buffer A is the recommended buffer for coupling. For pH labile ligands, use Buffer B. Do not add any protein (apart from your specific protein ligand), sugar etc. to these buffers.
- Buffer D and E are used for washing of all ligand-coupled beads. Buffer E can also be used for storage of ligand-coupled beads. Do not use these buffers or any buffer containing protein or aminogroups (e.g. glycine, Tris) for pre-washing or coupling to these beads. If BSA interferes with your downstream application, replace this with another protein (e.g. HSA) or a detergent (e.g. Tween® 20). Protein blocking is recommended as it reduces aggregation and non-specific binding. If a preservative is needed for the coupled beads, a final concentration of < 0.1% (w/v) sodium azide may be added to Buffer E.
Caution: Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides.

General Guidelines

- The ligand must be free of any protein, sugar or stabilizer, as these will compete with the ligand for available binding sites.
- If you use less than recommended amounts of antibodies, you might reduce the potential binding capacity.
- Addition of ammonium sulphate (Buffer C) to a final concentration of 1.2 M (1.0–1.5 M) will increase the amount of antibody coupled to the beads, and can give an improved performance in some applications.
- Maximal covalent binding of ligand to the beads is achieved after 12–18 hours at 37°C. Coupling at 20°C requires a longer incubation time of >20 hours to achieve the same degree of chemical binding. At 4°C the chemical binding is very slow (>48 hours). Buffer A is recommended at low temperatures.

Table 1: Recommended Buffers and Solutions

Buffer	Composition
Buffer A 0.1 M borate buffer pH 9.5	6.18 g H ₂ BO ₃ (MW 61.83). Dissolve in 800 mL distilled water. Adjust pH to 9.5 using 5M NaOH and adjust volume to 1 L with distilled water.
Buffer B 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4	2.62 g NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O (MW 137.99) and 14.42 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (MW 177.99). Adjust volume to 1 L with distilled water.
Buffer C 3 M ammonium sulphate in Buffer A or B	39.64 g (NH ₄) ₂ SO ₄ dissolved in Buffer A or B. Adjust pH with NaOH or HCl. Adjust up to 100 mL with Buffer A or B.
Buffer D PBS pH 7.4 with 0.5% (w/v) BSA	Add 0.88 g NaCl (MW 58.4) and 0.5% (w/v) BSA to 80 mL 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4. Mix thoroughly and adjust volume to 100 mL with 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4.
Buffer E PBS pH 7.4 with 0.1% (w/v) BSA	Add 0.88 g NaCl (MW 58.4) and 0.1% (w/v) BSA to 80 mL 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4. Mix thoroughly and adjust volume to 100 mL with 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4.

Protein Isolations

Dynabeads® M-280 Tosylactivated can be used to separate different proteins. Efficient isolation of target proteins depends on bead concentration, target protein concentration, the affinity of the bead-coupled ligand to the target protein as well as the incubation time. Equilibrium binding of target to ligand will be reached after 5–60 min. Binding can be performed at 2°C to 37°C, please note that lower temperatures generally requires longer incubation times than higher temperatures. One mg of conjugated beads typically binds 1–10 µg target protein, but varies from application to application. Optimization is therefore required. If target proteins are present at very low concentrations, an increase in the amount of ligand-coupled beads is usually required.

Elution of Proteins

The target protein may be concentrated by elution in small volumes (down to 10 µL). Conventional elution methods can be applied for elution of target protein from the beads (e.g. low pH (2.8–3.5), change in ionic strength, affinity elution and boiling in SDS-PAGE buffer). The method of choice depends on affinity of the target protein to the protein ligand coupled onto the beads, target protein stability, downstream application and detection methods. To avoid eluting off non-specific binding to the tube walls, change tube before you elute. It is possible to reuse the ligand-coupled beads after mild elution. To ensure reuse of the ligand-coupled beads and functionality of the isolated target protein, return both beads and target protein to physiological pH (7.4) immediately after elution.

Use of Dynabeads® in Immunoassays

Dynabeads® M-280 Tosylactivated can be used as a solid phase in immunoassays (IA). Combining specific antigens or antibodies and the superparamagnetic properties of the beads ensure rapid reaction kinetics both in the binding process and in the separation of the analyte. The detection system can be based on the use of enzymes, radioisotopes, fluorescent substances or chemiluminescence. Couple Dynabeads® M-280 Tosylactivated with your assay-specific antigen or antibody. A careful titration of antigen or antibody, as well as a titration of the exact amount of beads per test is important for optimal reaction kinetics. Immunoassays using Dynabeads® M-280 Tosylactivated are based on several principles:

- Couple the beads with an antigen and isolate specific antibodies against the antigen by a direct IA-method. Detection is done directly or indirectly with a secondary labeled antibody.
- Couple the beads with one antibody (Ab1) and allow reaction with the antigen. A labeled antibody (Ab2) reacting with a different epitope on the antigen is used to detect the initial antigen-antibody complex. In a two-site IA ("sandwich" IA) there are two possible procedures; either incubate the antigen first with the antibody (Ab1) coupled to the bead surface and then with the labeled antibody (Ab2), or first incubate the antigen with the labeled antibody (Ab2) before incubating with the bead-antibody (Ab1) to form the complex.
- Couple the beads with an antibody (Ab1) and allow reaction with the antigen and a labeled antigen in a competitive assay. Titrate the exact amount of beads for each IA-system. Depending on the antibodies used, assay conditions, detection system etc., 25–200 µg Ab-coupled beads per well (100 µL) is within normal range. Continuous mixing during the incubation of sample and beads is required. Reaction times of 10–60 min are generally sufficient. Determine the exact incubation time during your test optimization.

Protocols

Wash the Dynabeads®

See Table 2 for volume recommendation.

1. Resuspend the beads in the vial (i.e. vortex for >30 sec, or tilt and rotate for 5 min).
2. Transfer the desired volume of beads to a tube.
3. Add the same volume of Buffer A or B, or at least 1 mL, and resuspend.
4. Place the tube in a magnet for 1 min and discard the supernatant.
5. Remove the tube from the magnet and resuspend the washed beads in the same volume of Buffer A or B as the initial volume of beads (step 2).

Couple Ligands to the Dynabeads®

- This protocol is based on 5 mg (~165 µL) Dynabeads® M-280 Tosylactivated. It is not recommended to couple < 5 mg beads at a time. For larger volumes than 10 mg beads, scale up all volumes accordingly, as shown in Table 2.
 - Use 100 µg ligand/5 mg beads. The ligand volume (µL) is dependent on the ligand concentration (µg/µL) and must be calculated for each ligand, e.g. when coupling 5 mg beads, the Ab requirement is 100 µg. If the Ab concentration is 0.8 mg/mL you have to use 125 µL Ab (100 µg : 800 µg/mL = 0.125 mL).
 - The optimal coupling concentration is ~40 mg beads/mL (step 4). It is decreased to 20 mg/mL when coupling the smallest amount (5 mg beads), to allow for a sufficient volume for efficient mixing.
1. Transfer 165 µL washed and resuspended beads to a new tube, place in a magnet for 1 min, and remove the supernatant.
 2. Resuspend the beads in 100 µg ligand* and add Buffer A (or B) to give a total volume of 150 µL**. Mix thoroughly by vortex or pipetting.
 3. Add 100 µL Buffer C and mix by vortexing or pipetting.
 4. Incubate on a roller at 37°C for 12–18 hours.
 5. Place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
 6. Remove the tube from the magnet and add 1 mL Buffer D, incubate at 37°C for 1 hour on a roller.
 7. Place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
 8. Remove the tube from the magnet and add 1 mL Buffer E, vortex for 5–10 sec.
 9. Place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
 10. Repeat steps 7–8 once.
 11. Resuspend and dilute the beads in Buffer E to achieve your final desired bead concentration. See Table 2 for an example of 20 mg/mL.

Table 2: Volumes for ligand coupling to Dynabeads® M-280 Tosylactivated.

Step	Reagent volumes	5 mg beads	10 mg beads	50 mg beads
	Recommended tube	Micro-centrifuge tube	Micro-centrifuge tube	Flow tube
	Recommended magnet	DynaMag™-2	DynaMag™-2	DynaMag™-15
1	Dynabeads® M-280 Tosylactivated	165 µL	335 µL	1675 µL
2*	Ligand	100 µg	200 µg	1000 µg
2**	Add Buffer A or B. Ligand + Buffer A/B volume should be:	150 µL	150 µL	750 µg
3	Buffer C	100 µL	100 µL	500 µL
***	Total coupling volume	250 µL	250 µL	1250 µL
6	Buffer D	~1 mL	~1 mL	~ 5 mL
8–10	Buffer E	2 x ~1 mL	2 x ~1 mL	2 x ~5 mL
11	Resuspend in Buffer E (end conc. 20 mg/mL)	240 µL	480 µL	2.4 mL

* Calculate the volume from the ligand (µg/mL) concentration.

** Note: If the ligand concentration is low, leave out the coupling buffer.

*** Optimal coupling concentration is 40 mg beads/mL, but can be reduced to 20 mg/mL if the coupling volume is low.

Isolate Target Protein

- One mg of conjugated beads will typically bind 1–10 µg target protein, but varies from application to application. Thus, optimization is required. If the target proteins are present at very low concentrations, an increase in the amount of ligand-coupled beads is usually required. Example: If your target protein has a conc. of 10 µg protein/mL, you will need 100–1000 µL.
 - This protocol is based on 1 mg ligand-coupled beads as described. If you resuspended the beads to 20 mg/mL in step 11 above, 1 mg beads is equivalent to 50 µL.
1. Add 1-10 µg sample containing target protein to 50 µL of the ligand-coupled beads.
 2. Incubate with tilting and rotation to capture the target protein.
 3. Place the tube on the magnet for 2 min (longer for viscous samples). Pipet off the supernatant.
 4. Remove the tube from the magnet and add 1 mL Buffer D or E, vortex for 5–10 sec.
 5. Place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
 6. Repeat steps 4–5 twice.

Continue with e.g. elution or immunoassays. See "General Guidelines" for more info.

Description of Materials

Dynabeads® M-280 Tosylactivated are 2.8 µm uniform, superparamagnetic, polystyrene beads coated with a polyurethane layer. These Dynabeads® bind proteins physically and chemically through primary amino or sulfhydryl groups, with an increasing number of covalent bonds with higher temperature and pH.

Related Products

Product	Cat. no.
DynaMag™-2	12321D
DynaMag™-5	12303D
DynaMag™-15	12301D
Dynabeads® MyOne™ Tosylactivated	65501
HulaMixer® Sample Mixer	15920D

REF on labels is the symbol for catalog number.

Limited Use Label License

The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, nontransferable right to use the purchased amount of the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial applications of any kind, including, without limitation, quality control and commercial services such as reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008. Manufactured by Life Technologies AS, Norway. Life Technologies AS complies with the Quality System Standards ISO 9001:2008 and ISO 13485:2003.

Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.lifetechnologies.com/termsandconditions. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.lifetechnologies.com/support.

SPEC-06017

©2012 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) or their respective owners. Tween® is a registered trademark of Uniqema Americas, LLC. LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

For support visit www.lifetechnologies.com/support or email techsupport@lifetech.com

www.lifetechnologies.com



Annexe I : Fiche produit SU-8 2002



www.microchem.com

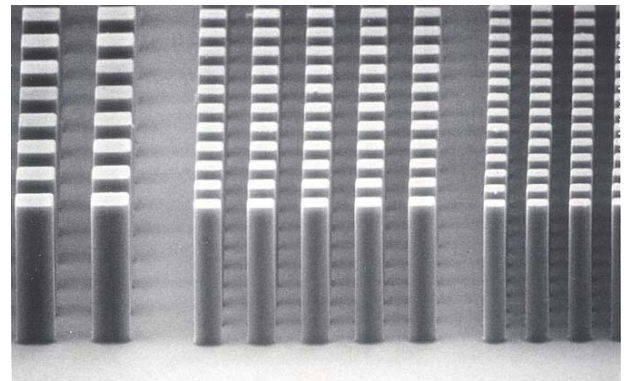
SU-8 2000

Permanent Epoxy Negative Photoresist

PROCESSING GUIDELINES FOR:

SU-8 2000.5, SU-8 2002, SU-8 2005, SU-8 2007, SU-8 2010 and SU-8 2015

SU-8 2000 is a high contrast, epoxy based photoresist designed for micromachining and other microelectronic applications, where a thick, chemically and thermally stable image is desired. SU-8 2000 is an improved formulation of SU-8, which has been widely used by MEMS producers for many years. The use of a faster drying, more polar solvent system results in improved coating quality and increases process throughput. SU-8 2000 is available in twelve standard viscosities. Film thicknesses of 0.5 to >200 microns can be achieved with a single coat process. The exposed and subsequently thermally cross-linked portions of the film are rendered insoluble to liquid developers. SU-8 2000 has excellent imaging characteristics and is capable of producing very high aspect ratio structures. SU-8 2000 has very high optical transmission above 360 nm, which makes it ideally suited for imaging near vertical sidewalls in very thick films. SU-8 2000 is best suited for permanent applications where it is imaged, cured and left on the device.



10 um features, 50 um SU-8 2000 coating

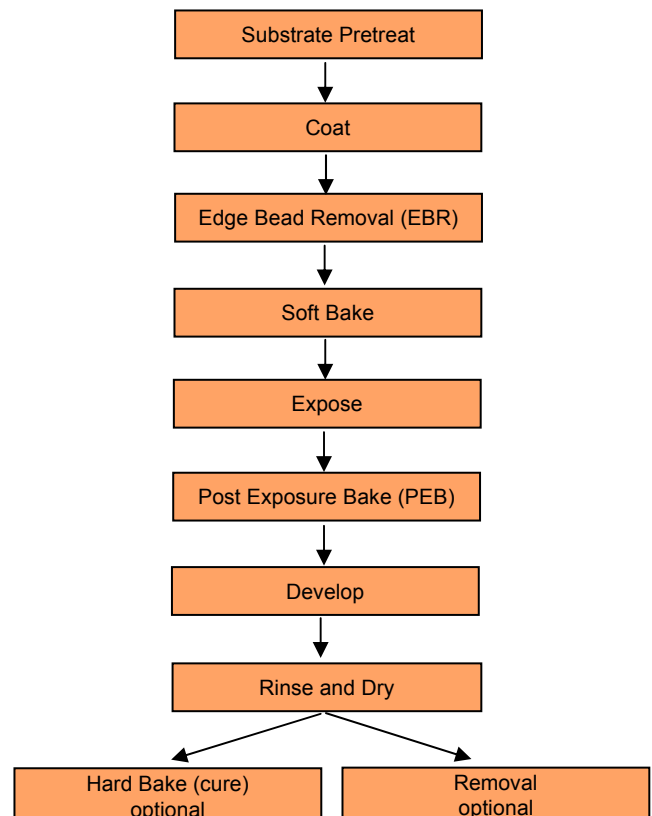
SU-8 2000 Features

- High aspect ratio imaging
- 0.5 to > 200 μm film thickness in a single coat
- Improved coating properties
- Faster drying for increased throughput
- Near UV (350-400 nm) processing
- Vertical sidewalls

Processing Guidelines

SU-8 2000 photoresist is most commonly exposed with conventional UV (350-400 nm) radiation, although i-line (365 nm) is the recommended wavelength. SU-8 2000 may also be exposed with e-beam or x-ray radiation. Upon exposure, cross-linking proceeds in two steps (1) formation of a strong acid during the exposure step, followed by (2) acid-catalyzed, thermally driven epoxy cross-linking during the post exposure bake (PEB) step. A normal process is: spin coat, soft bake, expose, PEB, followed by develop. A controlled hard bake is recommended to further cross-link the imaged SU-8 2000 structures when they will remain as part of the device. The entire process should be optimized for the specific application. The baseline information presented here is meant to be used as a starting point for determining a process.

Process Flow



Substrate Preparation

To obtain maximum process reliability, substrates should be clean and dry prior to applying SU-8 2000 resist. For best results, substrates should be cleaned with a piranha wet etch (using H₂SO₄ & H₂O₂) followed by a de-ionized water rinse. Substrates may also be cleaned using reactive ion etching (RIE) or any barrel asher supplied with oxygen. Adhesion promoters are typically not required. For applications that include electroplating, a pre-treatment of the substrate with MCC Primer 80/20 (HMDS) is recommended.

Coat

SU-8 2000 resists are available in twelve standard viscosities. This processing guideline document addresses six products: SU-8 2000.5, SU-8 2002, SU-8 2005, SU-8 2007, SU-8 2010 and SU-8 2015. Figures 1.a. and 1.b. provide the information required to select the appropriate SU-8 2000 resist and spin conditions to achieve the desired film thickness.

Recommended Program

- 1.) Dispense 1ml of resist for each inch (25mm) of substrate diameter.
- 2.) Spin at 500 rpm for 5-10 seconds with acceleration of 100 rpm/second.
- 3.) Spin at 2000 rpm for 30 seconds with acceleration of 300 rpm/second.

Figure 1.a. SU-8 2000 Spin Speed vs. Thickness

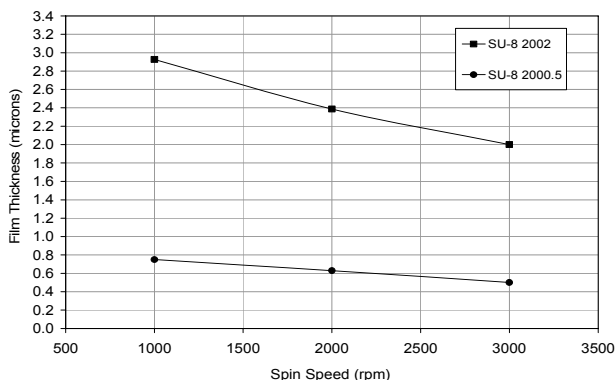


Figure 1.b. SU-8 2000 Spin Speed vs. Thickness

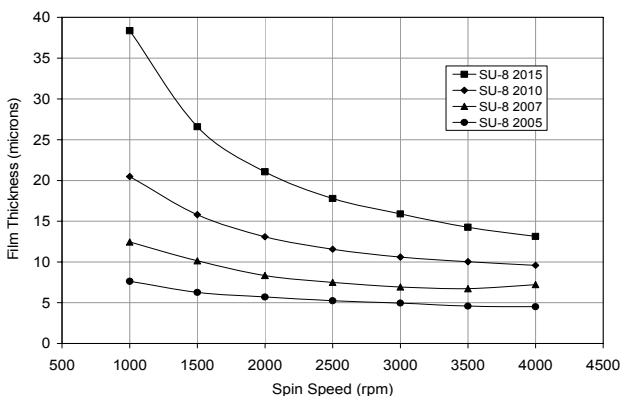


Table 1. SU-8 2000 Viscosity

SU-8 2000	% Solids	Viscosity (cSt)	Density (g/ml)
2000.5	14.3	2.49	1.070
2002	29.00	7.5	1.123
2005	45.00	45	1.164
2007	52.50	140	1.175
2010	58.00	380	1.187
2015	63.45	1250	1.200

Edge Bead Removal (EBR)

During the spin coat process step, a build up of photoresist may occur on the edge of the substrate. In order to minimize contamination of the hotplate, this thick bead should be removed. This can be accomplished by using a small stream of solvent (MicroChem's EBR PG) at the edge of the wafer either at the top or from the bottom. Most automated spin coaters now have this feature and can be programmed to do this automatically.

By removing any edge bead, the photomask can be placed into close contact with the wafer, resulting in improved resolution and aspect ratio.

Soft Bake

A level hotplate with good thermal control and uniformity is recommended for use during the Soft Bake step of the process. Convection ovens are not recommended. During convection oven baking, a skin may form on the resist. This skin can inhibit the evolution of solvent, resulting in incomplete drying of the film and/or extended bake times. Table 2. shows the recommended Soft Bake temperatures and times for the various SU-8 2000 products at selected film thicknesses.

Note: To optimize the baking times/conditions, remove the wafer from the hotplate after the prescribed time and allow it to cool to room temperature. Then, return the wafer to the hotplate. If the film 'wrinkles', leave the wafer on the hotplate for a few more minutes. Repeat the cool-down and heat-up cycle until 'wrinkles' are no longer seen in the film.

THICKNESS	SOFT BAKE TIME
microns	minutes @ 95°C
0.5 - 2	1
3 - 5	2
6 - 15	2 - 3
16 - 25	3 - 4
26 - 40	4 - 5

Table 2. Soft Bake Times

Optical Parameters

The dispersion curve and Cauchy coefficients are shown in Figure 3. This information is useful for film thickness measurements based on ellipsometry and other optical measurements.

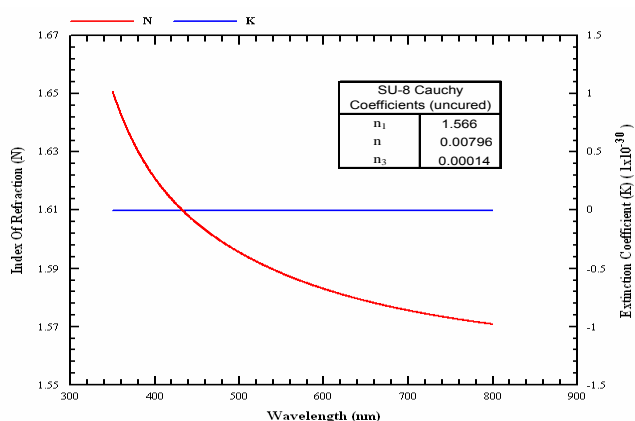


Figure 3. Cauchy Coefficients

Exposure

To obtain vertical sidewalls in the SU-8 2000 resist, we recommend the use of a long pass filter to eliminate UV radiation below 350 nm. With the recommended filter (PL-360-LP) from Omega Optical (www.omegafilters.com) or Asahi Technoglass filters V-42 plus UV-D35 (www.atgc.co.jp), an increase in exposure time of approximately 40% is required to reach the optimum exposure dose.

Note: With optimal exposure, a visible latent image will be seen in the film within 5-15 seconds after being placed on the PEB hotplate and not before. An exposure matrix experiment should be performed to determine the optimum dosage.

THICKNESS microns	EXPOSURE ENERGY mJ/cm ²
0.5 - 2	60 - 80
3 - 5	90 - 105
6 - 15	110 - 140
16 - 25	140 - 150
26 - 40	150 - 160

Table 3. Exposure Dose

	RELATIVE DOSE
Silicon	1X
Glass	1.5X
Pyrex	1.5X
Indium Tin Oxide	1.5X
Silicon Nitride	1.5 - 2X
Gold	1.5 - 2X
Aluminum	1.5 - 2X
Nickel Iron	1.5 - 2X
Copper	1.5 - 2X
Nickel	1.5 - 2X
Titanium	1.5 - 2X

Table 4. Exposure Doses for Various Substrates

Post Exposure Bake (PEB)

PEB should take place directly after exposure. Table 5. shows the recommended times and temperatures

Note: After 1 minute of PEB at 95°C, an image of the mask should be visible in the SU-8 2000 photoresist coating. If no visible latent image is seen during or after PEB this means that there was insufficient exposure, heating or both.

THICKNESS microns	POST EXPOSURE BAKE TIME minutes @ 95°C
0.5 - 2	1 - 2
3 - 5	2 - 3
6 - 15	3 - 4
16 - 25	4 - 5
26 - 40	5 - 6

Table 5. Post Exposure Bake Times

Development

SU-8 2000 photoresist has been designed for use in immersion, spray or spray-puddle processes with MicroChem's SU-8 developer. Other solvent based developers such as ethyl lactate and diacetone alcohol may also be used. Strong agitation is recommended when developing high aspect ratio and/or thick film structures. The recommended development times for immersion processes are given in Table 6. These development times are approximate, since actual dissolution rates can vary widely as a function of agitation

Note: The use of an ultrasonic or megasonic bath may be helpful when developing out via or hole patterns or structures with tight pitch.

THICKNESS microns	DEVELOPMENT TIME minutes
0.5 - 2	1
3 - 5	1
6 - 15	2 - 3
16 - 25	3 - 4
26 - 40	4 - 5

Table 6. Development Times for SU-8 Developer

Rinse and Dry

When using SU-8 developer, spray and wash the developed image with fresh solution for approximately 10 seconds, followed by a second spray/wash with Isopropyl Alcohol (IPA) for another 10 seconds. Air dry with filtered, pressurized air or nitrogen.

Note: A white film produced during IPA rinse is an indication of underdevelopment of the unexposed photoresist. Simply immerse or spray the substrate with additional SU-8 developer to remove the white film and complete the development process. Repeat the rinse step.

The use of an ultrasonic or megasonic bath will energize the solvent and allow for more effective development of the unexposed resist.

Physical Properties

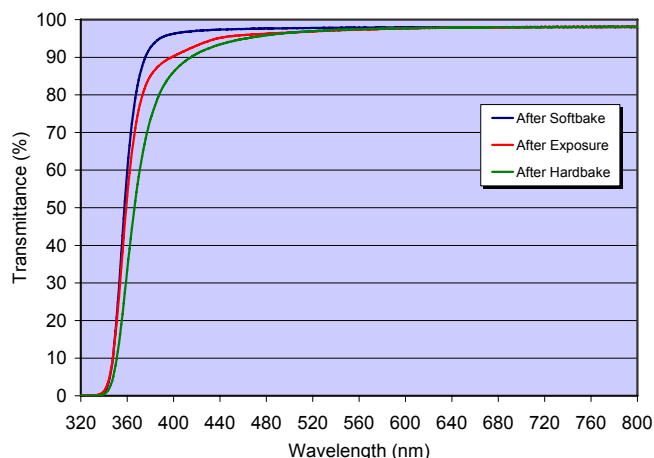
(Approximate values)

Adhesion Strength (mPa) Silicon/Glass/Glass & HMDS	38/35/35
Glass Transition Temperature (T _g °C), tan δ peak	210
Thermal Stability (°C @ 5% wt. loss)	315
Thermal Conductivity (W/mK)	0.3
Coeff. of Thermal Expansion (CTE ppm)	52
Tensile Strength (Mpa)	60
Elongation at break (ε _b %)	6.5
Young's Modulus (Gpa)	2.0
Dielectric Constant @ 10MHz	3.2
Water Absorption (% 85°C/85 RH)	0.65

Table 7. Physical Properties

Optical Properties

Figure 4. Optical Transmittance



Process conditions for Figure 4.

Softbake: 5 minutes at 95°C
 Exposure: 180 mJ/cm²
 Hardbake: 30 minutes at 300°C

Hard Bake (cure)

SU-8 2000 has good mechanical properties. However, for applications where the imaged resist is to be left as part of the final device, a hard bake can be incorporated into the process. This is generally only required if the final device or part is to be subject to thermal processing during regular operation. A hard bake or final cure step is added to ensure that SU-8 2000 properties do not change in actual use. SU-8 2000 is a thermal resin and as such its properties can continue to change when exposed to a higher temperature than previously encountered. We recommend using a final bake temperature 10°C higher than the maximum expected device operating temperature. Depending on the degree of cure required, a bake temperature in the range of 150°C to 250°C and for a time between 5 and 30 minutes is typically used.

Note: The hard bake step is also useful for annealing any surface cracks that may be evident after development. The recommended step is to bake at 150°C for a couple of minutes. This applies to all film thicknesses.



www.microchem.com

Removal

SU-8 2000 has been designed as a permanent, highly cross-linked epoxy material and it is extremely difficult to remove it with conventional solvent based resist strippers. MicroChem's Remover PG will swell and lift off minimally cross-linked SU-8 2000. However, if OmniCoat (30-100 nm) has been applied, immersion in Remover PG can effect a clean and thorough Lift-Off of the SU-8 2000 material. Fully cured or hard baked SU-8 2000 cannot be removed without the use of OmniCoat.

To remove minimally cross-linked SU-8 2000, or when using OmniCoat: Heat the Remover PG bath to 50-80°C and immerse the substrates for 30-90 minutes. Actual strip time will depend on resist thickness and cross-link density. For more information on MicroChem OmniCoat and Remover PG please see the relevant product data sheets.

To re-work fully cross-linked SU-8 2000: Wafers can be stripped using oxidizing acid solutions such as piranha etch, plasma ash, RIE, laser ablation and pyrolysis.

Plasma Removal

RIE 200W, 80 sccm O₂, 8 sccm CF₄, 100mTorr, 10°C

Storage

Store SU-8 2000 resists upright and in tightly closed containers in a cool, dry environment away from direct sunlight at a temperature of 40-70°F (4-21°C). Store away from light, acids, heat and sources of ignition. Shelf life is thirteen months from date of manufacture.

Disposal

SU-8 2000 resists may be included with other waste containing similar organic solvents to be discarded for destruction or reclaim in accordance with local state and federal regulations. It is the responsibility of the customer to ensure the disposal of SU-8 2000 resists and residues made in observance all federal, state, and local environmental regulations.

Environmental, Health and Safety

Consult the product Material Safety Data Sheet before working with SU-8 2000 resists. Handle with care. Wear chemical goggles, chemical gloves and suitable protective clothing when handling SU-8 2000 resists. Do not get into eyes, or onto skin or clothing. Use with adequate ventilation to avoid breathing vapors or mist. In case of contact with skin, wash affected area with soap and water. In case of contact with eyes, rinse immediately with water and flush for 15 minutes lifting eyelids frequently. Get emergency medical assistance.

The information is based on our experience and is, we believe to be reliable, but may not be complete. We make no guarantee or warranty, expressed or implied, regarding the information, use, handling, storage, or possession of these products, or the application of any process described herein or the results desired, since the conditions of use and handling of these products are beyond our control.

Disclaimer

Notwithstanding anything to the contrary contained in any sales documentation, e.g., purchase order forms, all sales are made on the following conditions:

All information contained in any MicroChem product literature reflects MicroChem's current knowledge on the subject and is, we believe, reliable. It is offered solely to provide possible suggestions for customer's own experiments and is not a substitute for any testing by customer to determine the suitability of any of MicroChem products for any particular purpose. This information may be subject to revision as new knowledge and experience becomes available, but MicroChem assumes no obligation to update or revise any data previously furnished to a customer; and if currency of data becomes an issue, customer should contact MicroChem requesting updates. Since MicroChem cannot anticipate all variations in actual end uses or in actual end-use conditions, it makes no claims, representations or warranties, express or implied including, without limitation any warranty of merchantability or fitness for a particular purpose; and customer waives all of the same. MicroChem expressly disclaims any responsibility or liability and assumes no responsibility or liability in connection with any use of this information including, without limitation, any use, handling, storage or possession of any MicroChem products, or the application of any process described herein or the results desired or anything relating to the design of the customer's products. Nothing in this publication is to be considered as a license to operate under or a recommendation to infringe any patent right.

Caution

This product is not designed or manufactured for, nor is it intended for use in any medical device or for any other medical application. Do not use this product in any medical applications [including, without limitation, any permanent implantation in the human body or any animals (other than laboratory animals used for experimental purposes), or contact with internal body fluids or tissues] unless otherwise expressly and specifically provided for in a written contract between MCC and the customer. The complete MicroChem Medical Disclaimer Statement is available upon request or on the MicroChem website at www.microchem.com.



1254 Chestnut St.
Newton, MA 02464
PHONE: 617.965.5511
FAX: 617.965.5818
EMAIL: sales@microchem.com
www.microchem.com

Annexe J : Fiche produit SU-8 2025



www.microchem.com

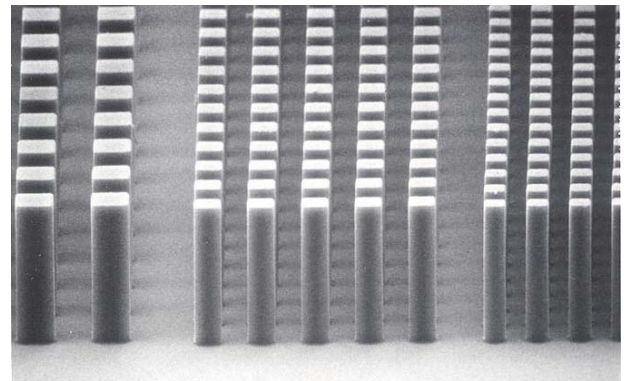
SU-8 2000

Permanent Epoxy Negative Photoresist

PROCESSING GUIDELINES FOR:

SU-8 2025, SU-8 2035, SU-8 2050 and SU-8 2075

SU-8 2000 is a high contrast, epoxy based photoresist designed for micromachining and other microelectronic applications, where a thick, chemically and thermally stable image is desired. SU-8 2000 is an improved formulation of SU-8, which has been widely used by MEMS producers for many years. The use of a faster drying, more polar solvent system results in improved coating quality and increases process throughput. SU-8 2000 is available in twelve standard viscosities. Film thicknesses of 0.5 to >200 microns can be achieved with a single coat process. The exposed and subsequently thermally cross-linked portions of the film are rendered insoluble to liquid developers. SU-8 2000 has excellent imaging characteristics and is capable of producing very high aspect ratio structures. SU-8 2000 has very high optical transmission above 360 nm, which makes it ideally suited for imaging near vertical sidewalls in very thick films. SU-8 2000 is best suited for permanent applications where it is imaged, cured and left on the device.



10 um features, 50 um SU-8 2000 coating

SU-8 2000 Features

- High aspect ratio imaging
- 0.5 to > 200 μm film thickness in a single coat
- Improved coating properties
- Faster drying for increased throughput
- Near UV (350-400 nm) processing
- Vertical sidewalls

Processing Guidelines

SU-8 2000 photoresist is most commonly exposed with conventional UV (350-400 nm) radiation, although i-line (365 nm) is the recommended wavelength. SU-8 2000 may also be exposed with e-beam or x-ray radiation. Upon exposure, cross-linking proceeds in two steps (1) formation of a strong acid during the exposure step, followed by (2) acid-catalyzed, thermally driven epoxy cross-linking during the post exposure bake (PEB) step. A normal process is: spin coat, soft bake, expose, PEB, followed by develop. A controlled hard bake is recommended to further cross-link the imaged SU-8 2000 structures when they will remain as part of the device. The entire process should be optimized for the specific application. The baseline information presented here is meant to be used as a starting point for determining a process.

Process Flow

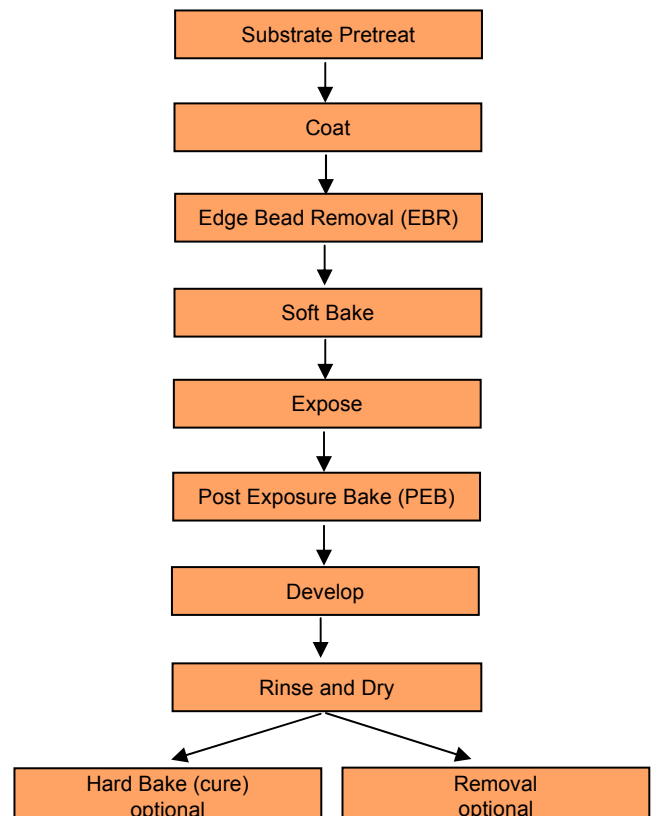


Table 1. SU-8 2000 Viscosity

SU-8 2000	% Solids	Viscosity (cSt)	Density (g/ml)
2025	68.55	4500	1.219
2035	69.95	7000	1.227
2050	71.65	12900	1.233
2075	73.45	22000	1.236

Substrate Preparation

To obtain maximum process reliability, substrates should be clean and dry prior to applying SU-8 2000 resist. For best results, substrates should be cleaned with a piranha wet etch (using H₂SO₄ & H₂O₂) followed by a de-ionized water rinse. Substrates may also be cleaned using reactive ion etching (RIE) or any barrel asher supplied with oxygen. Adhesion promoters are typically not required. For applications that include electroplating, a pre-treatment of the substrate with MCC Primer 80/20 (HMDS) is recommended.

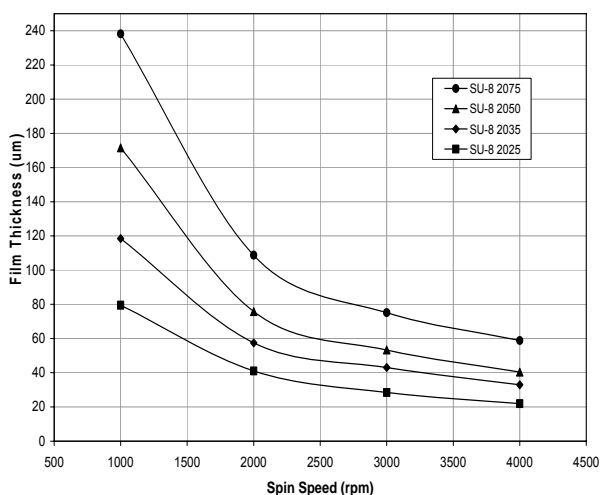
Coat

SU-8 2000 resists are available in twelve standard viscosities. This processing guideline document addresses four products: SU-8 2025, SU-8 2035, SU-8 2050 and SU-8 2075. Figure 1. provides the information required to select the appropriate SU-8 2000 resist and spin conditions to achieve the desired film thickness.

Recommended Program

- 1.) Dispense 1ml of resist for each inch (25mm) of substrate diameter.
- 2.) Spin at 500 rpm for 5-10 seconds with acceleration of 100 rpm/second.
- 3.) Spin at 2000 rpm for 30 seconds with acceleration of 300 rpm/second.

Figure 1. SU-8 2000 Spin Speed versus Thickness



Edge Bead Removal (EBR)

During the spin coat process step, a build up of photoresist may occur on the edge of the substrate. In order to minimize contamination of the hotplate, this thick bead should be removed. This can be accomplished by using a small stream of solvent (MicroChem's EBR PG) at the edge of the wafer either at the top or from the bottom. Most automated spin coaters now have this feature and can be programmed to do this automatically.

By removing any edge bead, the photomask can be placed into close contact with the wafer, resulting in improved resolution and aspect ratio.

Soft Bake

A level hotplate with good thermal control and uniformity is recommended for use during the Soft Bake step of the process. Convection ovens are not recommended. During convection oven baking, a skin may form on the resist. This skin can inhibit the evolution of solvent, resulting in incomplete drying of the film and/or extended bake times. Table 2. shows the recommended Soft Bake temperatures and times for the various SU-8 2000 products at selected film thicknesses.

Note: To optimize the baking times/conditions, remove the wafer from the hotplate after the prescribed time and allow it to cool to room temperature. Then, return the wafer to the hotplate. If the film 'wrinkles', leave the wafer on the hotplate for a few more minutes. Repeat the cool-down and heat-up cycle until 'wrinkles' are no longer seen in the film.

THICKNESS microns	SOFT BAKE TIMES	
	(65°C) minutes	(95°C) minutes
25 - 40	0 - 3	5 - 6
45 - 80	0 - 3	6 - 9
85 - 110	5	10 - 20
115 - 150	5	20 - 30
160 - 225	7	30 - 45

Table 2. Soft Bake Times

Optical Parameters

The dispersion curve and Cauchy coefficients are shown in Figure 3. This information is useful for film thickness measurements based on ellipsometry and other optical measurements.

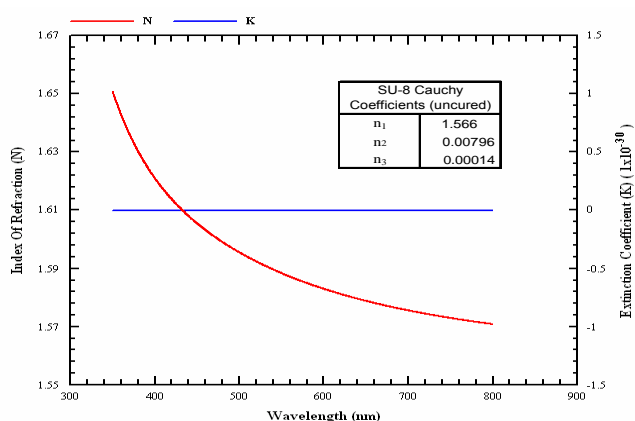


Figure 3. Cauchy Coefficients

Exposure

To obtain vertical sidewalls in the SU-8 2000 resist, we recommend the use of a long pass filter to eliminate UV radiation below 350 nm. With the recommended filter (PL-360-LP) from Omega Optical (www.omegafilters.com) or Asahi Technoglass filters V-42 plus UV-D35 (www.atgc.co.jp), an increase in exposure time of approximately 40% is required to reach the optimum exposure dose.

Note: With optimal exposure, a visible latent image will be seen in the film within 5-15 seconds after being placed on the PEB hotplate and not before. An exposure matrix experiment should be performed to determine the optimum dosage.

THICKNESS microns	EXPOSURE ENERGY mJ/cm ²
25 - 40	150 - 160
45 - 80	150 - 215
85 - 110	215 - 240
115 - 150	240 - 260
160 - 225	260 - 350

Table 3. Exposure Dose

	RELATIVE DOSE
Silicon	1X
Glass	1.5X
Pyrex	1.5X
Indium Tin Oxide	1.5X
Silicon Nitride	1.5 - 2X
Gold	1.5 - 2X
Aluminum	1.5 - 2X
Nickel Iron	1.5 - 2X
Copper	1.5 - 2X
Nickel	1.5 - 2X
Titanium	1.5 - 2X

Table 4. Exposure Doses for Various Substrates

Post Exposure Bake (PEB)

PEB should take place directly after exposure. Table 5. shows the recommended times and temperatures

Note: After 1 minute of PEB at 95°C, an image of the mask should be visible in the SU-8 2000 photoresist coating. If no visible latent image is seen during or after PEB this means that there was insufficient exposure, heating or both.

THICKNESS microns	PEB TIME (65°C)* minutes	PEB TIME (95°C) minutes
25 - 40	1	5 - 6
45 - 80	1 - 2	6 - 7
85 - 110	2 - 5	8 - 10
115 - 150	5	10 - 12
160 - 225	5	12 - 15

* Optional step for stress reduction

Table 5. Post Exposure Bake Times

Development

SU-8 2000 photoresist has been designed for use in immersion, spray or spray-puddle processes with MicroChem's SU-8 developer. Other solvent based developers such as ethyl lactate and diacetone alcohol may also be used. Strong agitation is recommended when developing high aspect ratio and/or thick film structures. The recommended development times for immersion processes are given in Table 6. These development times are approximate, since actual dissolution rates can vary widely as a function of agitation

Note: The use of an ultrasonic or megasonic bath may be helpful when developing out via or hole patterns or structures with tight pitch.

THICKNESS microns	DEVELOPMENT TIME minutes
25 - 40	4 - 5
45 - 75	5 - 7
80 - 110	7 - 10
115 - 150	10 - 15
160 - 225	15 - 17

Table 6. Development Times for SU-8 Developer

Rinse and Dry

When using SU-8 developer, spray and wash the developed image with fresh solution for approximately 10 seconds, followed by a second spray/wash with Isopropyl Alcohol (IPA) for another 10 seconds. Air dry with filtered, pressurized air or nitrogen.

Note: A white film produced during IPA rinse is an indication of underdevelopment of the unexposed photoresist. Simply immerse or spray the substrate with additional SU-8 developer to remove the white film and complete the development process. Repeat the rinse step.

The use of an ultrasonic or megasonic bath will energize the solvent and allow for more effective development of the unexposed resist.

Physical Properties

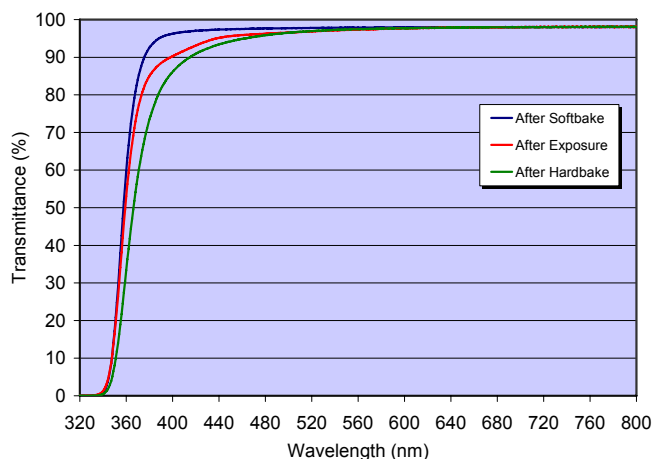
(Approximate values)

Adhesion Strength (mPa) Silicon/Glass/Glass & HMDS	38/35/35
Glass Transition Temperature (T _g °C), tan δ peak	210
Thermal Stability (°C @ 5% wt. loss)	315
Thermal Conductivity (W/mK)	0.3
Coeff. of Thermal Expansion (CTE ppm)	52
Tensile Strength (Mpa)	60
Elongation at break (ε _b %)	6.5
Young's Modulus (Gpa)	2.0
Dielectric Constant @ 10MHz	3.2
Water Absorption (% 85°C/85 RH)	0.65

Table 7. Physical Properties

Optical Properties

Figure 4. Optical Transmittance



Process conditions for Figure 4.

Softbake: 5 minutes at 95°C

Exposure: 180 mJ/cm²

Hardbake: 30 minutes at 300°C

Hard Bake (cure)

SU-8 2000 has good mechanical properties. However, for applications where the imaged resist is to be left as part of the final device, a hard bake can be incorporated into the process. This is generally only required if the final device or part is to be subject to thermal processing during regular operation. A hard bake or final cure step is added to ensure that SU-8 2000 properties do not change in actual use. SU-8 2000 is a thermal resin and as such its properties can continue to change when exposed to a higher temperature than previously encountered. We recommend using a final bake temperature 10°C higher than the maximum expected device operating temperature. Depending on the degree of cure required, a bake temperature in the range of 150°C to 250°C and for a time between 5 and 30 minutes is typically used.

Note: The hard bake step is also useful for annealing any surface cracks that may be evident after development. The recommended step is to bake at 150°C for a couple of minutes. This applies to all film thicknesses.



www.microchem.com

Removal

SU-8 2000 has been designed as a permanent, highly cross-linked epoxy material and it is extremely difficult to remove it with conventional solvent based resist strippers. MicroChem's Remover PG will swell and lift off minimally cross-linked SU-8 2000. However, if OmniCoat (30-100 nm) has been applied, immersion in Remover PG can effect a clean and thorough Lift-Off of the SU-8 2000 material. Fully cured or hard baked SU-8 2000 cannot be removed without the use of OmniCoat.

To remove minimally cross-linked SU-8 2000, or when using OmniCoat: Heat the Remover PG bath to 50-80°C and immerse the substrates for 30-90 minutes. Actual strip time will depend on resist thickness and cross-link density. For more information on MicroChem OmniCoat and Remover PG please see the relevant product data sheets.

To re-work fully cross-linked SU-8 2000: Wafers can be stripped using oxidizing acid solutions such as piranha etch, plasma ash, RIE, laser ablation and pyrolysis.

Plasma Removal

RIE 200W, 80 sccm O₂, 8 sccm CF₄, 100mTorr, 10°C

Storage

Store SU-8 2000 resists upright and in tightly closed containers in a cool, dry environment away from direct sunlight at a temperature of 40-70°F (4-21°C). Store away from light, acids, heat and sources of ignition. Shelf life is thirteen months from date of manufacture.

Disposal

SU-8 2000 resists may be included with other waste containing similar organic solvents to be discarded for destruction or reclaim in accordance with local state and federal regulations. It is the responsibility of the customer to ensure the disposal of SU-8 2000 resists and residues made in observance all federal, state, and local environmental regulations.

Environmental, Health and Safety

Consult the product Material Safety Data Sheet before working with SU-8 2000 resists. Handle with care. Wear chemical goggles, chemical gloves and suitable protective clothing when handling SU-8 2000 resists. Do not get into eyes, or onto skin or clothing. Use with adequate ventilation to avoid breathing vapors or mist. In case of contact with skin, wash affected area with soap and water. In case of contact with eyes, rinse immediately with water and flush for 15 minutes lifting eyelids frequently. Get emergency medical assistance.

The information is based on our experience and is, we believe to be reliable, but may not be complete. We make no guarantee or warranty, expressed or implied, regarding the information, use, handling, storage, or possession of these products, or the application of any process described herein or the results desired, since the conditions of use and handling of these products are beyond our control.

Disclaimer

Notwithstanding anything to the contrary contained in any sales documentation, e.g., purchase order forms, all sales are made on the following conditions:

All information contained in any MicroChem product literature reflects MicroChem's current knowledge on the subject and is, we believe, reliable. It is offered solely to provide possible suggestions for customer's own experiments and is not a substitute for any testing by customer to determine the suitability of any of MicroChem products for any particular purpose. This information may be subject to revision as new knowledge and experience becomes available, but MicroChem assumes no obligation to update or revise any data previously furnished to a customer; and if currency of data becomes an issue, customer should contact MicroChem requesting updates. Since MicroChem cannot anticipate all variations in actual end uses or in actual end-use conditions, it makes no claims, representations or warranties, express or implied including, without limitation any warranty of merchantability or fitness for a particular purpose; and customer waives all of the same. MicroChem expressly disclaims any responsibility or liability and assumes no responsibility or liability in connection with any use of this information including, without limitation, any use, handling, storage or possession of any MicroChem products, or the application of any process described herein or the results desired or anything relating to the design of the customer's products. Nothing in this publication is to be considered as a license to operate under or a recommendation to infringe any patent right.

Caution

This product is not designed or manufactured for, nor is it intended for use in any medical device or for any other medical application. Do not use this product in any medical applications [including, without limitation, any permanent implantation in the human body or any animals (other than laboratory animals used for experimental purposes), or contact with internal body fluids or tissues] unless otherwise expressly and specifically provided for in a written contract between MCC and the customer. The complete MicroChem Medical Disclaimer Statement is available upon request or on the MicroChem website at www.microchem.com.



1254 Chestnut St.
Newton, MA 02464
PHONE: 617.965.5511
FAX: 617.965.5818
EMAIL: sales@microchem.com
www.microchem.com

Annexe K : Fiche produit NOA 81



NORLAND PRODUCTS INCORPORATED

2540 Route 130, Bldg 100, Cranbury, NJ 08512

Tel • 609-395-1966

Fax • 609-395-9006

Website: www.norlandproducts.com

Norland Optical Adhesive 81

Norland Optical Adhesive 81 ("NOA81") is a single component liquid adhesive that cures in seconds to a tough, hard polymer when exposed to ultraviolet light. It is recommended as an extremely fast and efficient way to precisely bond optical components or fiber optics. It can be cured in a thin layer between two transparent substrates or applied as a drop to form a bridge between two components. Exposure to UV light quickly cures the adhesive and holds the components in place.

The outstanding characteristic of this adhesive is its extremely fast cure. Thin films can be initially set in under 10 seconds and thick films in 20 seconds using the light sources listed below. It is also extremely stable when not exposed to UV light. NOA 81 will not gel up in dispenser tips or cure before you want it to.

NOA 81 is sensitive to the entire range of long wavelength light from 320 to 380 nanometers with peak sensitivity around 365 nm. Cure time is dependent on light intensity and thickness of the drop applied. To fully cure the material requires 2 Joules/sq. cm of energy. The adhesive is designed to be cured with small hand held or desktop UV light sources that are easy to use.

Recommended Light Sources		
HAND HELD	MANUFACTURER	APPROX. CURE TIME
RC-250	Xenon Corp. Wilmington, MA	10-60 seconds at 1/2 inch
Opticure 4 Light Gun	Norland Products Cranbury, NJ	10-60 seconds at 1/4 inch
DESK TOP	MANUFACTURER	APPROX. CURE TIME
Portascan 100	American Ultraviolet Chatham, NJ	10-60 seconds at 6 inches
SB-100P Spot Lamp	Mercury* Spectronics Corp. Westbury, NY	10-60 seconds at 6 inches

**Distributed by Norland Products Inc.*

NOA 81 cures to a hard film but it will not become brittle. It has a small amount of resiliency that provides strain relief from vibrations or temperature extremes. This toughness insures long term performance of the adhesive bond.

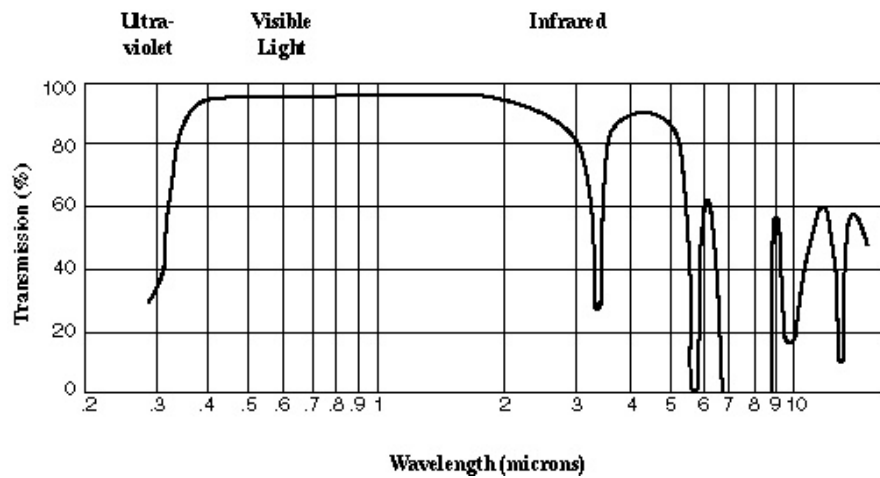
NOA 81 cures from the surface down and longer cures are required for thicker films to allow UV light to penetrate to the full depth. After curing, it has very good adhesion to glass, metals, printed circuit boards and other glass filled plastics. This adhesion improves with age with optimum adhesion reached after room temperature aging for one week. This optimum adhesion can be accelerated by aging at 50° C for 12 hours. The cured adhesives can withstand temperatures from -150°C to 125° C.

To remove uncured adhesive from the substrate use an acetone or alcohol moistened cloth. The cured adhesive can be separated by soaking in a chlorinated solvent such as methylene chloride. Normally, the bonded area will separate overnight if only precured. Longer times may be necessary depending upon the extent of the cure and the size of the bond area.

Typical Properties of NOA 81	
Solids	100%
Viscosity at 25° C	300 cps
Refractive Index of Cured Polymer	1.56
Elongation at Failure	25%
Modulus of Elasticity (psi)	200,000
Tensile Strength (psi)	4,000
Hardness - Shore D	90

Shelf life of the liquid is at least 4 months from the date of shipment if stored in a cool (5-22° C), dark place in the original container. If refrigerated, allow the adhesive to come to room temperature prior to use.

Spectral Transmission of NOA 81



Care should be taken in handling this material. The Material Safety Data Sheet should be read for this product as well as for any associated products such as alcohol, acetone or methylene chloride. Prolonged contact with skin should be avoided and affected areas should be thoroughly washed with copious amounts of soap and water. If the adhesive gets into the eyes, flush with water for 15 minutes and seek medical attention. Use the material in a well ventilated area, otherwise a NIOSH approved organic vapor mask is recommended.

The data contained in this technical data sheet is of a general nature and is based on laboratory test conditions. Norland Products does not warrant the data contained in this data sheet. Norland does not assume responsibility for test or performance results obtained by users. It is the users responsibility to determine the suitability for their product application, purposes and the suitability for use in the user's intended manufacturing apparatus and methods. The user should adopt such precautions and use guidelines as may be reasonably advisable or necessary for the protection of property and persons. Nothing in this technical data sheet shall act as a representation that the product use or application will not infringe a patent owned by someone other than Norland Products or act as a grant of a license under any Norland Products Inc patent. Norland Products recommends that each user test its proposed use and application before putting into production.

Annexe L : Protocole de fabrication des capteurs.

Gravure des capteurs

- Lavage sous ultrasons des couches GMR (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes),
- Séchage sous flux d'azote,
- Enduction de résine photosensible positive S-1805 étalée à la tournette (2 s à 500 RPM 300 RPM/s, 60 s à 4000 RPM 300 rpm/s et 2 s à 6000 RPM 1000 RPM/s)
- Recuit 3 minutes à 110°C.
- Insolation 10 s par la MJB4 (Karl Süss, 10mW/cm², 365 nm) à travers un masque en quartz contenant les motifs des capteurs (yokes) en chrome.
- Développement de 45 s en MF319,
- Rinçage à l'eau déionisée, séchage sous flux d'azote
- Recuit 3 minutes à 110°C.
- Gravure ionique (Plassy) pendant 20 minutes.
- Lift off (bain d'acétone sous ultrasons).

Dépôt des contacts

- Lavage sous ultrasons des couches GMR (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes),
- Séchage sous flux d'azote,
- Enduction de résine positive photosensible S-1813 et étalée à la tournette (2 s à 500 RPM 300 RPM/s, 60 s à 4000 RPM 300 RPM/s et 2 s à 6000 RPM 1000 RPM/s),
- Recuit 3 minutes à 110°C,
- Exposition 15 s à la MJB4 à travers un masque en chrome contenant les motifs en quartz des contacts,
- Développement en MF319 de 45 s,
- Rinçage à l'eau et séchage sous flux d'azote,
- Recuit de 3 minutes à 110°C,
- Dépôt par évaporation de 10 nm de titane puis 150 nm d'or dans un bâti de dépôt par épitaxie moléculaire (Plassy),
- Lift off.

Dépôt de la passivation

- Lavage sous ultrasons des couches GMR (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes),
- Séchage sous flux d'azote,
- Enduction de résine positive photosensible S-1813 étalée à la tournette (2 s à 500 RPM 300 RPM/s, 60 s à 4000 RPM 300 RPM/s et 2 s à 6000 RPM 1000 RPM/s),
- Recuit 3 minutes à 110°C,
- Exposition 15 s à la MJB4 à travers un masque en chrome contenant les motifs en quartz des plots de contacts,
- Développement en MF319 de 45 s,
- Rinçage à l'eau et séchage sous flux d'azote,
- Recuit de 3 minutes à 110°C,
- Dépôt par pulvérisation de 100 nm de Al₂O₃ dans un bâti de dépôt par épitaxie moléculaire (Plassy),
- Lift off.

Annexe M : Protocole de montage puce deux étages en SU-8.

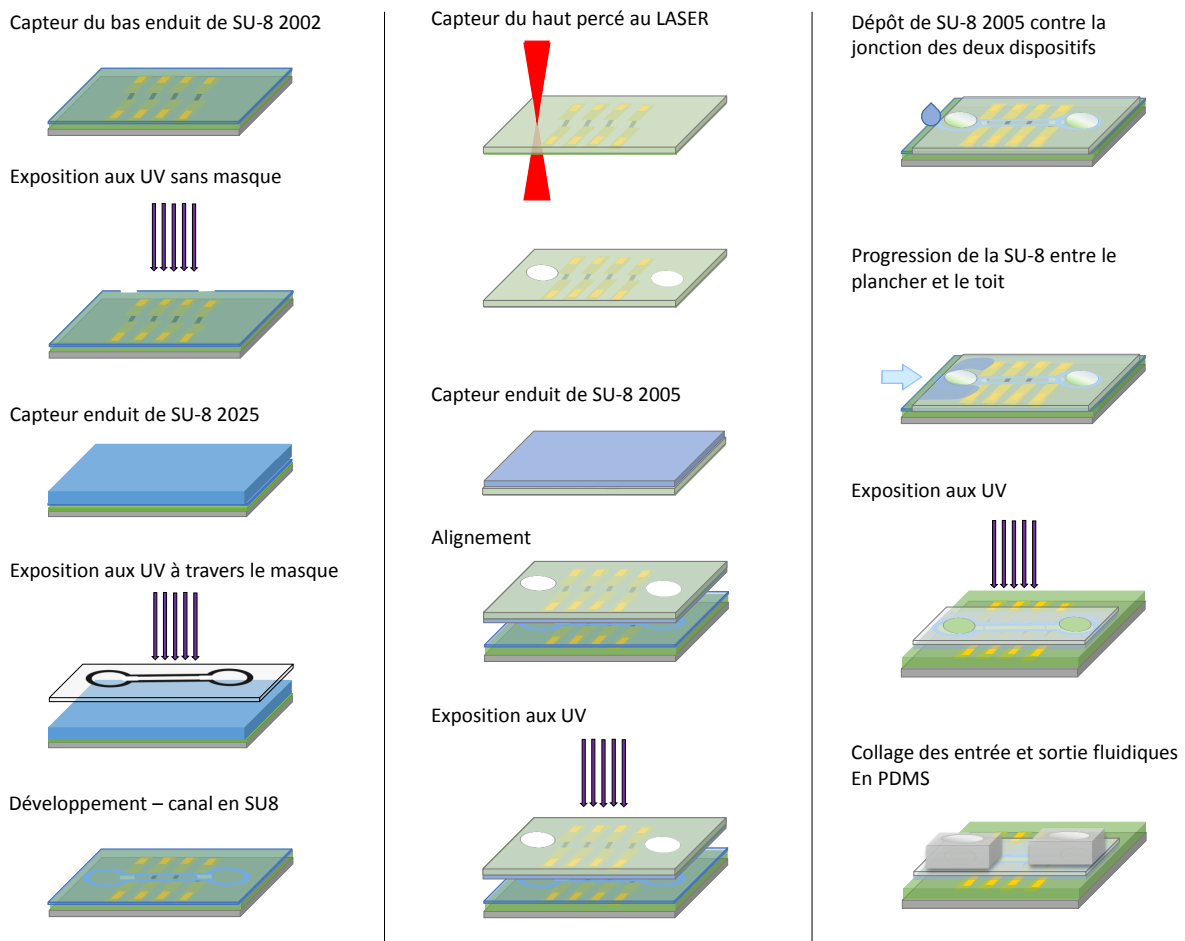


FIGURE 8 – Description schématique des différentes étapes de production d'une puce en SU-8. Ce protocole a été établi selon l'idée qu'une meilleure herméticité du dispositif s'obtient plus simplement lorsque le collage est effectué sur une faible surface. D'autre part toutes les étapes sont constituées de SU-8 dont on sait qu'elle convient au voisinage du capteur. Les murs en SU-8 du canal sont obtenus par une photolithographie classique sur le plancher du dispositif, il est ensuite refermé par un toit enduit d'une fine couche de SU-8. Enfin, la puce est consolidée par l'ajout de SU-8 qui est introduite entre les deux wafers et vient agrandir leur surface de contact.

L'ensemble du protocole est décrit schématiquement sur la Fig. 8.

Capteur du bas

- Lavage sous ultrasons de l'échantillon (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes),
- Séchage sous flux d'azote, déshydratation (10 minutes à 120°C),
- Activation de sa surface par un plasma de dioxygène (40 s à 0.1 mbar, 100 W),
- Enduction de SU-8 2002 à la tournette (5 s 500 RPM 300 RPM/s puis 120 s 6000 RPM 300 RPM/s),
- Recuit de 1 minute à 65°C puis 5 minutes à 95°C,
- Exposition de 40 s sans masque à la MJB3 (Karl Süss, 5mW/cm², 405 nm),
- Recuit de 1 minute à 65°C puis 5 minutes à 95°C,
- Mesure au profilomètre mécanique de l'épaisseur de la couche d'accroche.
- Enduction de SU-8 2025 à la tournette (5 s 500 RPM 300 RPM/ 30 s 3500 RPM 300 RPM/s, 5 s 6000 RPM 800 RPM/s pour 20 µm),
- Recuit de 1 minute à 65°C suivi d'une rampe de 7 minutes en température jusqu'à 90°C puis 4 minutes à 90°C,

- Exposition de 28 s à travers le masque formant le canal à la MJB3. (Dans ce protocole, le canal est uniquement constitué de murs d'une largeur de 30 μm formant son squelette),
- Recuit de 1 minute à 65°C puis 4 minutes à 90°C,
- Développement en SU-8 developer (4 minutes sous faible agitation),
- Nettoyage en isopropanol puis eau déionisée,
- Recuit final de 5 minutes à 95°C,
- Mesure au profilomètre mécanique de la hauteur du canal.

Capteur du haut

- Découpe au LASER (EXCIMER) des entrée et sortie des capillaires vers le canal dans le substrat du dispositif comprenant les capteurs du haut. (Pendant cette étape, les capteurs sont protégés par une couche de résine photosensible non exposée.)
- Lavage sous ultrasons de l'échantillon (acétone 3 minutes, isopropanol 3 minutes),
- Séchage sous flux d'azote, déshydratation (10 minutes à 120°C),
- Activation de sa surface par un plasma de dioxygène (40 s à 0.1 mbar, 100 W),
- Enduction de SU-8 2005 à la tournette (5 s 500 RPM 300 RPM/s puis 80 s à 7000 RPM, 500 RPM/s).

Montage de la puce

- Alignement des deux parties de la puce sous MJB3,
- Insolation de 40 s avec une légère surpression à l'assemblage, (en surveillant au microscope l'avancée de la colle sur les murs du canal)
- Introduction de SU-8 2005 entre les deux surfaces, au plus proche de l'un des deux réservoirs. (Sa progression par capillarité le long des parois du canal est surveillée au microscope.)
- Insolation 200 s à la MJB3.

Connections fluidiques de la puce

- Mélange de la base de PDMS avec un réticulant dans des proportions 10 :1 (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI),
- Dégazage sous vide pendant 1h,
- Recuit d'une nuit à 70°C dans une boîte de Pétri,
- Découpe d'un morceau de PDMS pour l'entrée et la sortie du canal, poiçonnage,
- Nettoyage au scotch et à l'isopropanol de la surface du PDMS,
- Nettoyage à l'isopropanol des entrée et sortie de la puce,
- Plasma (20 s à 40 W sous 0.1 mbar de dioxygène) sur la puce et le PDMS,
- Alignement des entrée et sortie de la puce et des joints en PDMS (le contact doit être réalisé en moins de 2 minutes),
- Recuit de 10 minutes à 120°C.

Connections électriques de la puce



- Le substrat du capteur du bas est collé à la cire (fusion à 110°C) sur un PCB
- Des calles de même hauteur que la puce sont collées de part et d'autre du capteur sur ce PCB
- Le substrat du capteur du haut et le PCB du bas sont collés simultanément sur le PCB du haut à la cire (fusion à 110°C)
- Le dispositif est vissé sur un support adapté pour effectuer les microsoudures
- La connection des capteurs au circuit est faite par microsoudure à ultrasons (TPT wire bonder HB10) utilisant un fil d'aluminium de 50 μm de diamètre.

Annexe N : Article publié



Article

Evaluation of In-Flow Magnetoresistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool

Manon Giraud ^{1,2}, François-Damien Delapierre ¹, Anne Wijkhuisen ², Pierre Bonville ¹ ,
Mathieu Thévenin ¹, Gregory Cannies ¹, Marc Plaisance ², Elodie Paul ¹, Eric Ezan ³,
Stéphanie Simon ² , Claude Fermon ¹, Cécile Féraudet-Tarisse ^{2,†} and
Guénaëlle Jasmin-Lebras ^{1,*,†}

¹ SPEC, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, CEA Saclay, CEDEX, 91191 Gif-sur-Yvette, France

² Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse, CEA, INRA, Université Paris-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

³ Direction des Programmes et des Partenariats Publics, Département de la Recherche Fondamentale, CEA, 91191 Gif-sur-Yvette, France

* Correspondence: guenaelle.jasmin-lebras@cea.fr

† These authors contributed equally to this work.

Received: 7 August 2019; Accepted: 29 August 2019; Published: 31 August 2019



Abstract: Inexpensive simple medical devices allowing fast and reliable counting of whole cells are of interest for diagnosis and treatment monitoring. Magnetic-based labs on a chip are one of the possibilities currently studied to address this issue. Giant magnetoresistance (GMR) sensors offer both great sensitivity and device integrability with microfluidics and electronics. When used on a dynamic system, GMR-based biochips are able to detect magnetically labeled individual cells. In this article, a rigorous evaluation of the main characteristics of this magnetic medical device (specificity, sensitivity, time of use and variability) are presented and compared to those of both an ELISA test and a conventional flow cytometer, using an eukaryotic malignant cell line model in physiological conditions (NS1 murine cells in phosphate buffer saline). We describe a proof of specificity of a GMR sensor detection of magnetically labeled cells. The limit of detection of the actual system was shown to be similar to the ELISA one and 10 times higher than the cytometer one.

Keywords: diagnostic; GMR sensor; whole cell

1. Introduction

Routine diagnosis, treatment monitoring and treatment choice would greatly benefit from inexpensive and easy to use versatile devices capable of counting a small amount of whole cells of interest (cancer cells or bacteria) in different matrices [1–4]. A good example of the lack of adapted screening is breast cancer. Indeed, while it can be cured if detected early, it remains the most lethal cancer for women in developed countries [5].

The flow cytometry, developed since 1965 [6], is the gold standard for whole cell study and labeling. It continues to improve and allows for an increasing number of biological characterizations. The understanding of many biological processes like immune response or cell cycle, the screening of drug efficacy and the enrichment of the data bank about antigen distribution in different cell types are some examples of the huge impact of this technology on the field of fundamental biology [7]. In addition to its wide and growing interest for research purpose, flow cytometry has become routinely used in clinical laboratories over the last 20 years for different pathologies [7–9]. This technology is mainly applied in hematology but also in immunology and oncology. For these different disciplines, flow cytometry is used with different purposes like diagnosis, prognosis or treatment monitoring.

The main advantages of this technology are the sensitivity and its possibility to measure simultaneously more than 20 parameters per cell [7]. It can also be applied to any cell type from bacteria to circulating tumor cells and to many different biological matrices (blood, bone marrow, solid tissues etc.) [8]. However, this technology still has some drawbacks preventing it from its use for clinical purposes: (i) these devices remain costly, bulky, the data treatment need skilled professionals and cannot be efficiently automated, (ii) the use of fluorescent antibodies makes this technique even more expensive and technically heavy as it necessitates washing steps and (iii) flow cytometry was not developed primarily to count cells but rather to recognize certain cell sub-populations. Some cytometers can give an absolute cell count but discrepancies between devices are common [10].

For early diagnosis purpose and the quantification of disease markers, several other techniques are already available in hospitals and clinical laboratories. Most of detection techniques like mass spectrometry, Western blots or techniques based on Polymerase Chain Reaction require lysis of cells to work with their inner DNA or proteins. In the context of whole cell study however, methods detecting specifically cells by their membrane markers are more relevant. The ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay), largely used, is typically applied to determine the concentration of molecular species in a suspension [11]. This technique is easily transposed to antigens expressed at cell surface as it has been done previously with bacteria [12]. The advantage of ELISA test is its simplicity, high throughput and relative low cost. However, this test still requires trained staff and requires relative long incubation time to reach its nominative performance (for instance the accuracy and reproducibility of the results depend on the reaction time [13]).

Several methods of easy to use cheap sensitive cell counters are being developed by numerous research groups. The development of micro-technologies for biological studies has paved the way for the creation of new devices relying on different detection systems for fast diagnosis. Different solutions are being developed to miniaturize flow cytometers and to simplify its use [14,15]. Optical detection is extremely performant but it requires lasers, precise alignments and interference with some matrices is a common problem either due to their auto-fluorescence or because of solubility issues [16]. Thus, alternative electrochemical or magnetic measurements using simpler detection systems have been proposed and even commercialized [17–22]. However these static methods imply washing steps and are conceived for proteins, DNA, RNA or small bacteria detection rather than for eukaryotic cells [23–26]. Moreover, non-specific interactions remain numerous with this type of devices, leading to reduced sensitivity [27,28]. Taking advantage of the high sensitivity of superconducting quantum interference device (SQUID) or fluxgates, several groups developed static techniques based on magnetorelaxometry [29–31]. These tools eliminate the need for washing steps as they discriminate free from bonded magnetic labels. However, SQUID operate at low temperature and their production is quite expensive [32]. Fluxgate-based techniques recently offered proof of their potential by detecting C-reactive protein in serum in 30 min. Still, the electronic circuitry needed for results analyze must be further miniaturized [33]. Other approach are developed in parallel with simpler, less sensitive sensors. Dynamic methods using magnetic detection have been developed first on ferrofluid droplets [34] and raised an increasing interest since Loureiro et al. showed the ability of such devices to detect magnetic objects one by one [35,36] and thus their potential to reach an extremely low detection limit [37]. In addition, the sample can be prepared and tested without any washing step because of the dynamic magnetic detection, insensitive to matrix optical properties [38]. Nevertheless, if washing steps were needed anyway (eg. complex matrices or sample concentration requirements), the system could still offer this possibility as washings can be performed easily with the use of a simple permanent magnet allowing to immobilize beads from the matrix and which is a field-compatible method.

Several methods of magnetic detection have been proposed based on magnetic resonance effect, susceptibility measurements, giant magnetoimpedance (GMI), Hall Effect, Tunnel Magneto Resistance effect (TMR) or Giant Magneto Resistance effect (GMR) [24,39–44]. As biological objects are not magnetic and cannot be detected alone using magnetic sensors, the target must first be bound to magnetic particles (MPs or beads). This is possible thanks to antibodies (Abs), whose MPs are coated

with, recognizing the target. The very high specificity of antibodies provides an easy way to target precisely the analyte of interest. Moreover the production of polyclonal as well as monoclonal antibodies (mAbs) directed against a given target is now a well-handled procedure in biology labs [45,46]. In a typical magnetic detection process, the mixture of the sample and mAbs-coated MPs is introduced into a microchannel where it flows above the sensors that detect the passage of magnetically labeled biological objects. Several groups worked with GMI sensors, using superparamagnetic particles and Helmholtz coils to generate the AC signal [42,43]. The use of GMR sensors is also a convenient choice for small objects detection due to their high sensitivity and their ease of production [25,39,47–50]. GMR sensors can now be produced industrially and their size tuned to match the target's and thus optimize the sensitivity. Moreover, they do not need an AC field to detect the passage of magnetic beads and thus their instrumentation can be simple.

Although several very interesting developments of this technique have been achieved, some difficulties remain [25]. In particular, the binding of the MPs to the target implies mixing the sample with a highly concentrated beads suspension to ensure that the target will meet and bind MPs in a reasonable time. Consequently a lot of free unbound MPs will linger in solution. Moreover, when the target analyte is a living cell, there is inevitably a discrepancy of distribution of the number of magnetic beads bound to each cell. This is due to the natural distribution variation of the number of epitopes per cell recognized by mAbs. Since MPs tend to agglomerate in physiological conditions, the signals created by cells have to be compared not only to those created by single MPs but also to those created by MP aggregates whose sizes depends on the bead type and concentration and on the matrix used. Furthermore, as the signal amplitude depends greatly on the distance between the object and the sensor, it is possible that a small aggregate of beads, moving above the sensor at a short distance gives the same signal as a biological object covered with numerous MPs but flowing further above it. In an attempt to overcome this limit, some ideas have been recently proposed. One consists in using flow focusing to concentrate the detected objects in the bottom half of the channel and avoid this uncertainty [51–53]. Yet, while screening tools must remain simple, the use of flow focusing adds a sheath fluid whose flow must be judiciously adjusted. Another idea relying on chip design combining mechanical and magnetophoretic guiding has been proposed to drag all magnetic material at the bottom of the channel without the need of sheath fluid. This method requires precise adaptation to each system and has not been evaluated on any biological model yet [54].

In this work, we suggest a third technique to discriminate specific signals from aggregates, consisting in heightening the floor of the channel above the magnetic sensors so that single beads or small aggregates cannot be detected. We present a complete and reliable process of detection, including negative controls to evaluate specificity, a sensitivity study and a variability evaluation. We have developed a magnetoresistive cell counting device using murine myeloma cells as a biological model. The results have been compared with two standard methods of detection mentioned previously, a microplate sandwich ELISA immunoassay and flow cytometry using the same reagents (mAbs, buffer, samples), which is the only reliable way to compare accurately methods. Similar performances were obtained for the ELISA test and the GMR test while flow cytometry obtained a ten times lower limit of detection.

2. Materials and Methods

2.1. Sensor Fabrication

The spin valve layers are deposited on a 300 μm thick silicon wafer. The thin films arrangement can be described as follows: Ta(3)/Ni₈₀Fe₂₀(3.5)/Co₉₀Fe₁₀(1.5)/Cu(2.3)/Co₉₀Fe₁₀(2.1)/Ru(0.85)/Co₉₀Fe₁₀(2.0)/Pt₅₀Mn₅₀(18)/Ta(3)/Ru(3) where the thickness of layers is given in nanometers and the target composition is given in percentages. The sensors are then patterned by UV photolithography in a positive resin S1805 and then etched by ion beam etching (IBE). The contact pads are deposited by evaporation of a bilayer Ti(3 nm)/Au(100 nm), after having been designed by photolithography

in S1813 positive resin. Finally, a passivation bilayer of 150 nm thick Al_2O_3 and 150 nm thick Si_3N_4 are deposited by sputtering on the whole chip surface except on the contact pads. The usual sensor resistance was around 600 Ω . This passivation layer insures a good lifetime of the sensors in aggressive matrices.

2.2. Microfluidic Channel Fabrication

The microfluidic channel has been realized by using a classical protocol [55]. A layer of PDMS of an expected thickness of 6 μm is spin-coated (5 min, 2700 rpm, 300 rpm/s) on the sensors after a plasma O_2 treatment (15 s, 40 mW, 0.1 mbar) to improve the adhesion. The device is then heated at 110 $^\circ\text{C}$ during 20 min and at 60 $^\circ\text{C}$ at least for 45 min. In parallel, the 25 μm high and 100 μm wide PDMS channel was molded over an SU-8 mold obtained by UV photolithography and measured by a mechanical profilometer (Alpha-Step, KLA Tencor, Mipitas, CA, USA). After demolding, the injection holes are made in the PDMS using a puncher. After the same aforementioned plasma treatment, the channel is aligned above the sensor using an MJB4 aligner and put in contact with the substrate. The chips are then heated for 20 min at 120 $^\circ\text{C}$ and for 1 h at 60 $^\circ\text{C}$.

2.3. Cell Culture

Two cell lines were used for the study: first, the NS1, murine myeloma cells, showing an average diameter of 6 μm and expressing at their surface the CD138 protein (Syndecan-1) and second, the Chinese Hamster Ovary cells (CHO) with an average diameter of 10 μm that do not express the CD138 protein. The cell culture media were from Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.

NS1 cells were cultivated in Dulbecco's medium with 15% of foetal bovine serum, 1% of non-essential amino acids, 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% of L-glutamine at 37 $^\circ\text{C}$ under a controlled atmosphere containing 7% of CO_2 . They were centrifuged at 1000 RPM (centrifuge diameter 344 mm) for 10 min at 9 $^\circ\text{C}$ and then diluted in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Gibco, Life Technologies) in which the tests were carried out.

CHO cells were cultivated in Ham F-12 Nutrient Mixture with 10% of foetal bovine serum, 1% of non-essential amino acids, 1% of antibiotics (penicillin and streptomycin) and 1% of L-glutamine at 37 $^\circ\text{C}$ under a control atmosphere containing 5% of CO_2 . They were washed two times in PBS, let in a solution of 0.25% trypsin-EDTA for 5 min at 37 $^\circ\text{C}$ and were centrifuged at 1000 RPM (centrifuge diameter 344 mm) for 5 min at 9 $^\circ\text{C}$. Finally, they were diluted in PBS before use.

2.4. Production of IpaD-315 Antibodies

Six to 8-week-old female BALB/c mice were purchased from Janvier Labs, France and maintained in accordance with the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (European Community [EC] Directive 86/609, French Law 2001-486, 6 June 2001) and with agreement of the ethical committee (CETEA) no. 15-055 delivered to S. Simon and agreement D-91-272-106 from the Veterinary Inspection Department of Essonne (France). Up to eight mice were kept in each cage and housed in a temperature-regulated-room and had free access to food and water. All animals' experiments were performed to minimize suffering according to the guideline of the CETEA committee. IpaD-315 murine monoclonal antibody was produced in the LERI laboratory (SPI/CEA Saclay, France). It was raised in BALB/c mice by repeated intranasal immunizations with 20 μg of purified recombinant IpaD protein expressed in *E. coli* BL21DE(3) [56]. *Ipad* gene was amplified from *Shigella flexneri* (CIP 82.48T) and cloned into the IPTG inducible pET22b(+) vector (Novagen) allowing insertion of a poly-histidine tag sequence at the 3' end of the gene used for protein purification. Hybridomas were produced by fusing spleen cells of immunized mice with NS1 myeloma cells, according to Köhler and Milstein [45]. IpaD-315 monoclonal antibody was then produced in ascite fluids in BALB/C mouse and further purified by protein A affinity chromatography. The purity of IpaD-315 mAb was assessed by SDS-PAGE in reducing and non-reducing conditions and its isotype determination was performed using Pierce rapid ELISA mouse antibody isotyping kit (Thermo Scientific).

2.5. Particle Functionalization

Dynabeads My One Streptavidin T1 were selected. They are 1 μm diameter homogeneous polymer particles embedding superparamagnetic iron oxide nanoparticles. They have been functionalized with two different monoclonal antibodies of the same IgG2a isotype: a rat anti-CD138 mAb (BD Pharmingen) and a murine mAb, IpaD-315 (described in Section 2.4), according to the commercial protocol after their biotinylation and purification.

For mAb biotinylation, 100 μg of antibodies were diluted in 400 μL of 0.1 M borate buffer pH 9.0 containing 6 μL of biotin (Sigma-Aldrich) in DMF at 1 mg/mL and incubated for 30 min at room temperature. Then, 100 μL of 1 M Tris HCl buffer pH 8.0 were added and incubated for 15 min. Finally, the biotinylated mAb was purified from free biotin on Zeba Desalt Spin column (Thermo Scientific) in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 with 0.15 M NaCl. The absorbance of the final solution was measured between 280 and 320 nm to determine the concentration of the purified biotinylated antibody. Biotinylated antibodies were then mixed at room temperature with streptavidin coated beads for 30 min, washed four times in PBS 0.1% BSA and stored in PBS 0.1% BSA at 4 $^{\circ}\text{C}$ until use.

2.6. MP Cell Labeling

Several cell concentrations have been used: 10^5 , 3×10^4 , 10^4 , 3×10^3 and 10^3 cells/mL while the MP concentration was set to 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ corresponding to 2×10^7 antibodies-coated beads per milliliter. Indeed, the beads concentration must be independent of the cell concentration as this value is unknown in a real sample. In addition to the positive samples with the targeted MP-labeled cells with concentrations described above, three negative samples were prepared and used in experiments: (i) 1 mL of buffer containing only the 23 μg of beads functionalized with anti-CD138 antibody, (ii) 1 mL of buffer containing 10^5 NS1 cells and 23 μg of the beads functionalized with control IpaD-315 antibody and (iii) 1 mL of buffer containing 10^5 CHO cells and the 23 μg of beads functionalized with anti-CD138 antibody. Indeed, the detection of typical signals does not mean necessarily that a myeloma cell has been detected: it could also be an aggregate of beads or some MPs bound via non-specific interactions on another kind of cells. A comparison with negative samples is thus needed. The Table 1 summarizes the samples used.

Table 1. Summary of used samples.

Sample Type	Cells/mL	Antibody Beads Coating
Positive	1×10^5 NS1	anti-CD138
	3×10^4 NS1	anti-CD138
	1×10^4 NS1	anti-CD138
	3×10^3 NS1	anti-CD138
	1×10^3 NS1	anti-CD138
Negative	1×10^5 NS1	IpaD315
	1×10^5 CHO	anti-CD138
	No cell	anti-CD138

The cells of each sample have been counted at the beginning of each experiment to check the nominal concentration using a Malassez cell. After mixing the MPs with cell suspensions, the samples were incubated at room temperature under a slow rotation for two hours.

2.7. Experimental Set-Up

In an experiment, superparamagnetic objects (labeled cells, unbound MPs and MPs aggregates) magnetized by a permanent magnetic field are flowing above the sensor in a microfluidic channel. The magnetic field must be as homogeneous as possible. Indeed, magnetic gradients, by exerting locally a magnetic force on the particles, can lead to local accumulation of beads in the channel and even clog it. The chips and the inlet and outlet reservoirs are thus inserted in the permanent field created

by two ferrite magnets of $3 \times 3 \times 10 \text{ cm}^3$ on sides closed with two soft 8 mm iron sheets on top and bottom (see Figure 1a). Using this device, the magnetic field varies by less than 1 mT over the entire surface of the chip (which is 1.5 cm long by 5 mm wide) (see Figure 1b), while the vertical magnetic field reaches 90 mT. The chip is fixed on a support whose angles can be finely tuned to maximize the sensor sensitivity (see Figure 1c). The sensitivity is maximal when the external field is rigorously perpendicular to the sensor surface. At the beginning of each experiment, the position of the sensor is set using a calibrated coil fixed on the magnet which generates a 1 kHz in-plane reference magnetic signal. The aim of this positioning is to maximize the sensitivity and to minimize the noise of the resulting signal. Indeed, the precise location of the sensor influences the random telegraphic noise that appears in some configurations. Then, these two characteristics are measured. The smallest detectable signal, called threshold, is defined as having an amplitude exceeding three times the noise level. In a typical experiment, the sensor noise was evaluated at $50 \text{ nT}/\sqrt{\text{Hz}}$, there was $6 \text{ }\mu\text{V}$ of noise on the whole bandwidth of 15 kHz and the sensor sensitivity was $2.5 \text{ }\% \cdot \text{mT}^{-1}$.

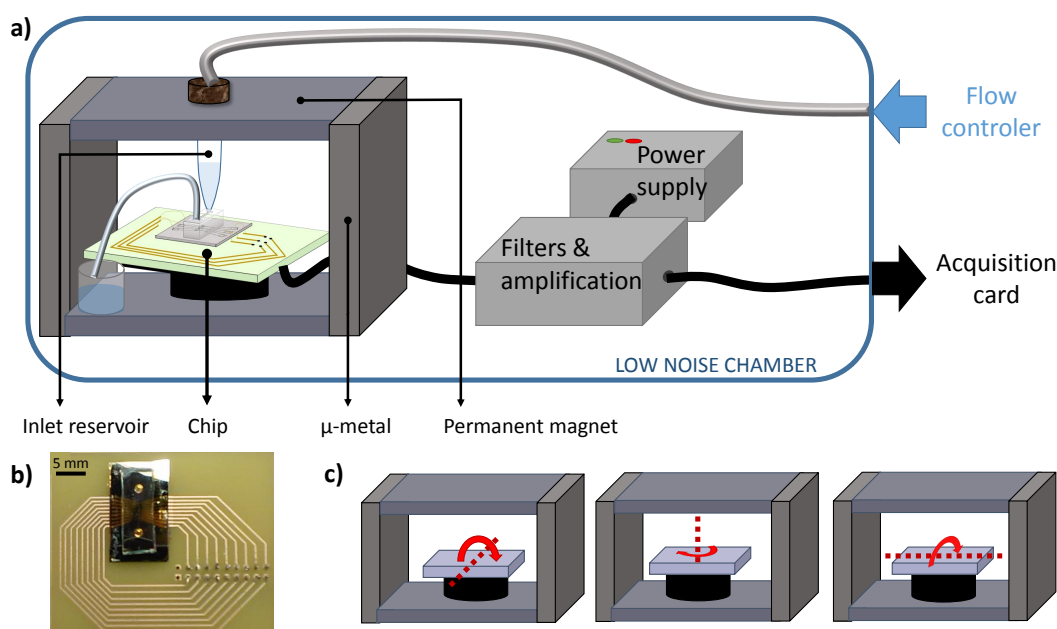


Figure 1. Experimental set-up and data. (a) The chip, the reservoir and the collecting vial are inserted in a homogeneous magnetic field. A computer program is controlling the flow using a pressure driver. The applied pressure is set to 300 mbar. Homemade electronic boxes deliver power to the sensor, amplify and filter the signals before sending the data outside the low-noise chamber to the acquisition card. (b) Chip photograph. (c) Positioning angles.

The device and electronic boxes were used in a magnetically shielded room ($2.9 \times 2.9 \times 2.3 \text{ m}^3$) made of three μ -metal layers and three aluminum layers. In this environment, the noise level is of $1 \text{ nT}/\sqrt{\text{Hz}}$ which is low compared to the intrinsic sensor noise. In a real commercial device, a reference GMR sensor (outside of the microfluidic channel) is enough to subtract environmental noise, mainly the 50 or 60 Hz magnetic field created by power lines as it has already been done by some groups [57,58].

The flow is driven by a pressure controller (MFCSTM-EZ: Microfluidic Flow Control System, Fluigent[®]) and the pressure is set to 300 mbar, typically a sample of 1 mL is flowed in 30 min. The liquid sample is directly injected at the top of the inlet reservoir, made of polyoxymethylene to minimize cells and beads adhesion on its walls. This reservoir is set in vertical position to insure that sedimentation would not impede some cells to go into the channel. The wet part of the reservoir is

completely localized in the gap between the two magnets to minimize magnetic forces exerted on the content.

2.8. Electronics

The electronics is battery supplied to avoid 50 Hz noise. The sensors are biased at voltages between 1 to 2 V and the output signal is amplified 500 times by a low noise preamplifier and filtered at 15 kHz with an additional gain of 20. The signal is then oversampled at 200 kHz using a Data Translation[®] acquisition card controlled by a homemade software. A schematic view of this set-up is presented in Figure 1a. Then, a homemade software identifies the signals from the total recording and discriminates them from noise artifacts. Numerical parameters were evaluated on a cohort of several thousands of examples from different experiments. For each spotted point above the threshold, the local minimum and maximum are determined by repeatedly incrementing the interval of interest by 15 points until the maximum (i_{max} , V_{max}) and minimum (i_{min} , V_{min}) determined are more than 20 points from each edge of the interval. The user determines the direction of signals ($k = 1$ if $i_{max} - i_{min} < 0$ and $k = -1$ if $i_{max} - i_{min} > 0$) and the detection threshold (V_{thr}). Several checks are then carried out to validate the recording of this peak in the processed file. They must be bipolar ($|V_{min}| > 1/3V_{thr}$ and $|V_{max}| > 1/3V_{thr}$) with the right orientation ($k(i_{max} - i_{min}) < 0$), their width ($i_{max} - i_{min}$) must be coherent with the flow velocity (between 25 μ s and 2.5 ms) and they must be sufficiently symmetric ($|\frac{V_{max} - V_{min}}{V_{max} + V_{min}}| < 0.4$). This last criteria was added to better discriminate signals from radiotelegraphic noise occurring in some experiments. Experimental data before and after treatment are presented respectively in Figure 2a,b.

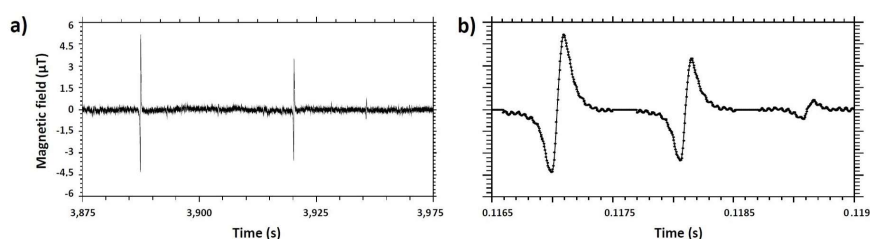


Figure 2. Experimental data. (a) Raw experimental recording. (b) Recording of the software-selected portions (the same 3 signals are shown).

2.9. Comparative ELISA Tests

96 wells plates were coated with anti-CD138 antibody. In each well, 100 μ L of a suspension of 10 μ g/mL of antibodies in potassium phosphate buffer at 50 mM, pH 7.4 were deposited and incubated overnight at 20 $^{\circ}$ C. The following day, wells were emptied and filled with 300 μ L of EIA buffer (100 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 containing 0.1% bovine serum albumin, 0.15 M NaCl and 0.01% sodium azide). The plates were sealed and stored at 4 $^{\circ}$ C until use.

The day of the experiment, the coated plate was washed once in a washing buffer (50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4), 100 μ L of serial dilutions of NS1 cells (3 10^6 ; 10^6 ; 3 10^5 ; 10^5 ; 3 10^4 ; 10^4 ; 3 10^3 ; 10^3 cells/mL) in PBS were added per well and incubated under agitation at room temperature for 2 h. Then, the plate was washed three times in the washing buffer and 100 μ L of a suspension of biotinylated antibody anti-CD138 at 200 ng/mL in EIA buffer without sodium azide were added per well for a 2h-incubation step under agitation at room temperature. The plate was then washed three times in the washing buffer and 100 μ L of a solution of streptavidin conjugated with polymers of horseradish peroxidase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted 15,000 fold in EIA buffer without azide was added into the wells. Finally, after 30 min of incubation under agitation at room temperature, the plate was washed 5 times in the washing buffer and 100 μ L of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, ThermoFisher Scientific) were added per well. After 30 min at room temperature under agitation, 100 μ L of 2 M sulfuric acid were added per well and the absorbance

of each well was measured at 450 nm (wavelength of absorption of the reaction product) and 620 nm (noise measurement).

The subtraction of these two measurements yields the specific signal directly proportional to NS1 cell concentration. The theoretical limit of detection is defined as the lowest cell concentration giving a signal greater than the non-specific binding (mean of eight measurements of EIA buffer) + 3 standard deviations (99.7% confidence). The theoretical limit of quantification is defined as the lowest cell concentration giving a signal greater than the non-specific binding (mean of eight measurements of EIA buffer) + 10 standard deviations (99.9% confidence).

2.10. Comparative Flow Cytometry Tests

For flow cytometry analysis, NS1 cells were washed once with PBS/0.5% BSA and 200 μ L of serial dilutions of cells (10^5 ; 3×10^4 ; 10^4 ; 3×10^3 ; 10^3 cells/mL) were incubated for 2 h at 4 °C with anti-mouse CD138 labeled with Phycoerythrin (BD Biosciences). After incubation, cells were washed twice with PBS/0.5% BSA and resuspended in 200 μ L of PBS/0.5% BSA. The fluorescence was finally assayed for the total volume of 200 μ L using a Novocyte flow cytometer (ACEA) and the number of stained cells was evaluated by comparison with cells incubated with buffer alone. Results were analysed using NovoExpress software.

3. Results and Discussion

3.1. Simulations of Single Magnetic Beads and MP-Labeled Cells

A GMR sensor is composed of two ferromagnetic metallic layers separated by a nonmagnetic one as shown in Figure 3a. The magnetization of one of these layers is pinned in one direction while the magnetization of the other one is free to rotate in its plane. As the speed of propagation of electrons in a metal strongly depends on the relative orientation of its spin and the magnetization of the metal, this spintronic device will have different properties for spin up and spin down electrons. Depending on the angle between the magnetizations of the two ferromagnetic layers, the overall resistance of the sensor varies as shown in Figure 3b. During the detection process, the MPs themselves are magnetized perpendicularly to the sensor plane by a field created with a permanent magnet and emit a dipolar field. Only the in-plane component of the dipolar field created by the beads is detected by the magnetic sensor since thin-film GMR sensors are insensitive to out-of-plane field variations (z direction) below a critical value. The sensor yoke geometry, designed especially to have just one magnetic domain [59], is shown in Figure 3d and presents a high aspect ratio. This strong asymmetry between the length and width of the device will tend to align all the moments from the free layer according to its length to reduce the magnetostatic energy by moving the two poles created as far as possible from each other. The free layer magnetization is thus along the x axis at zero field, while the other layer is pinned along the y axis. The device is in its most sensitive configuration at zero field and is sensitive only to the y component of the field. Moreover, improving the alignment of moments from the free layer results in a more linear behavior of the sensor. GMR sensors response to small magnetic fields variations are linear on a range of about ± 2 mT around zero field (see Figure 3b), which includes the whole range of fields needed for this application.

The situation to be modeled is presented in Figure 3c. Magnetized objects circulate above the sensor in a laminar flow in a microchannel and induce magnetic field variations that are detected by the sensor. Three types of magnetic objects are modeled: single magnetic beads, aggregates of beads and MPs-labeled cells.

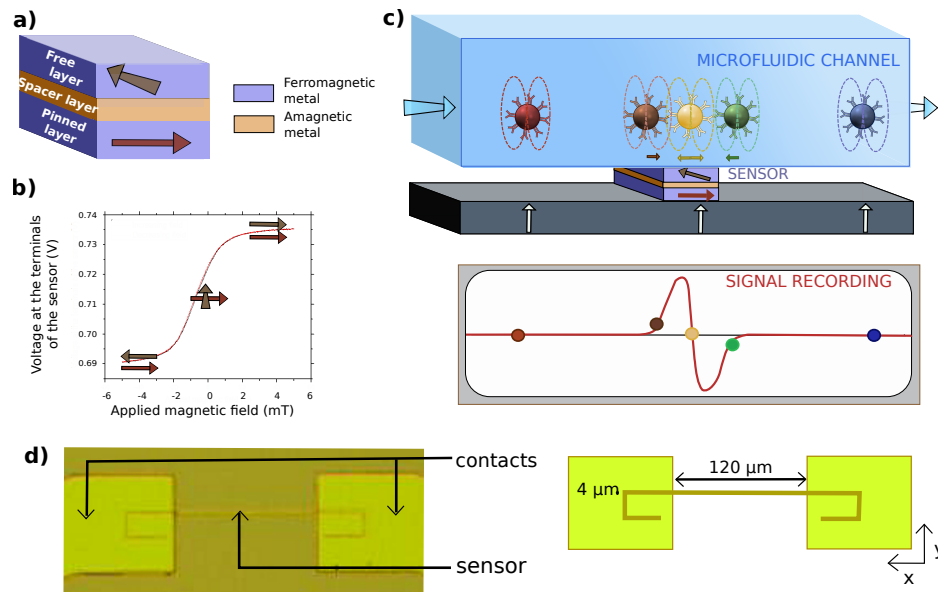


Figure 3. Giant magnetoresistance (GMR) sensor. (a) Scheme of the main components of a GMR stack. Free and pinned layers are ferromagnetic and their magnetization are represented by arrows. The spacer is a diamagnetic conductor. (b) Experimental sensitivity curve with schematic representation of the relative orientations of the two ferromagnetic layers. This sensor shows a sensitivity of $2\% \cdot \text{mT}^{-1}$ and no hysteresis on its linear portion. (c) Schematic of the experiment: Labeled objects are moved by the laminar flow at a given height crossing the sensor at constant speed. The sensor detects variations of the magnetic field due to the induced dipolar field of the beads. The beads are magnetized by a field normal to the sensor plane created by a permanent magnet. (d) Photograph and scheme of a processed GMR sensor in yoke shape. The sensor measures $120\ \mu\text{m}$ along the x axis and $4\ \mu\text{m}$ along the y axis.

The signal corresponding to a single bead moving above the sensor is proportional to the integral over the whole sensor surface of the y-component of the local dipolar field induced at each successive position. For a MP in position (x_B, y_B, z_B) with a moment $\vec{\mu}$ making an angle θ with \vec{z} and ϕ with \vec{x} and moving above a sensor of length L and width l , it is given by the Formula (1) [60].

$$\begin{aligned}
 H_y = & \frac{\mu}{Ll} \left(\left(\frac{y_l}{q_2^2} \left(\frac{x_r}{r_2} - \frac{x_l}{r_1} \right) + \frac{y_r}{q_4^2} \left(\frac{x_l}{r_4} - \frac{x_r}{r_3} \right) \right) \sin \theta \sin \psi \right. \\
 & + \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_3} - \frac{1}{r_4} \right) \sin \theta \cos \psi \\
 & \left. + \left(\frac{h}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) + \frac{h}{q_4^2} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \cos \theta \right)
 \end{aligned} \tag{1}$$

where $x_r, x_l, y_r, y_l, h, r_1, r_2, r_3, r_4, q_2$ and q_4 are defined as follows.

$$\begin{aligned}
 x_r &= \frac{L}{2} - x_B & x_l &= -\frac{L}{2} - x_B \\
 y_r &= \frac{l}{2} - y_B & y_l &= -\frac{l}{2} - y_B \\
 h &= z_B - z_C \\
 r_1 &= \sqrt{x_l^2 + y_l^2 + h^2} & r_2 &= \sqrt{x_r^2 + y_l^2 + h^2} \\
 r_3 &= \sqrt{x_r^2 + y_r^2 + h^2} & r_4 &= \sqrt{x_l^2 + y_r^2 + h^2} \\
 q_2 &= \sqrt{y_l^2 + h^2} & q_4 &= \sqrt{y_r^2 + h^2}
 \end{aligned}$$

After several simulation tests (data not shown), it has been concluded that the influence of the spatial distribution of the moments in the aggregates was negligible. Signals from aggregates of N beads are simulated as N times the signals coming from a single bead with the same parameters.

On the contrary, the distribution of MPs on the cell surface was proven to have an influence on the generated signals, as presented in Figure 4b. Cells are thus simulated as spheres with several magnetic beads distributed randomly on their surfaces and with a random angle θ between the direction of their moment and the vertical axis with the constraint of a total magnetization equal to the experimentally measured one (see Section 3.2). This observation leads to the conclusion that detecting one passage with one single sensor cannot be sufficient to deduce precisely the nature and the details of the detected object.

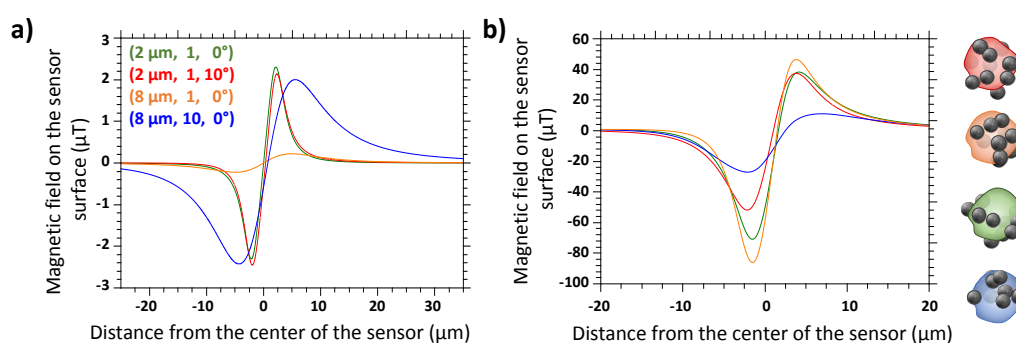


Figure 4. (a) Simulation results of the magnetic object detection demonstrating the influence of the three main parameters: distance between object and sensor (Z), number of magnetic particles (MPs) (N) and moment orientation (θ). Curves are labeled by the triplet (Z, N, θ) . (b) Simulation results for a $6 \mu\text{m}$ diameter cell at $6 \mu\text{m}$ height covered by 10 MPs, with four sets of random positions of the beads on the cell surface.

However, our objective is to discriminate the MP-labeled cells from the aggregates of magnetic beads. Three experimental parameters must be chosen together to optimize the discrimination: (i) the chip design, (ii) the permanent magnet, (iii) the magnetic particles. Indeed, with fixed values for these three settings, the values of the two parameters determining the signal shape (the height of the magnetic object and its magnetic moment) are framed. The object distance from the sensor has the largest importance on the amplitude of the signal as shown on Figure 4a. As a consequence, to increase the impact of the number of MPs per object on the resulting signal (value correlated to the nature of this object), the object distance from the sensor needs to be the most homogeneous as possible, hence, the channel must be the smallest possible. This parameter was set to $25 \mu\text{m}$, the lowest value at which the channel would not clog after 2 h of use. The permanent magnet must be chosen so that its field is sufficient to have a small average angle θ between the beads magnetic moments and the vertical axis but must be low enough not to pull the pinned layer of the sensor out of plane. This value was set at 90 mT as it was a good compromise knowing the MPs magnetization curves. The choice of the magnetic beads and of the chip design are explained in the following paragraphs.

3.2. Deduction of Best Experimental Conditions

The chip design was optimized by testing different configurations of the sensor and microchannel geometries on simulated samples. The main idea was to make some static changes that would not complicate the use of the device but would enhance the discrimination between “positive” and “negative” samples. Samples are called “positive” if they are supposed to contain MPs-labeled cells (they contain a specific complex mAbs-coated beads/cells possessing antigens targeted by the mAbs) and “negative” if they are not, see Table 1.

3.2.1. Sample Characterization

The two kinds of samples had thus to be experimentally characterized to make a proper model. Five sorts of commercial magnetic beads ranging from 200 nm to 2.8 μm in diameter from three companies were tested for the preparation of these samples. Indeed, the choice of MPs is important. Ideal beads should have a magnetic moment sufficiently high to be attracted by a permanent magnet within few minutes to enable simple and quick washing steps (required for mAbs functionalization of MPs before performing the test). They should also have a low saturation field so that a permanent magnet of 90 mT is enough to reach quasi-saturation and, above all, they must present the lowest propensity to aggregation. All these properties were investigated as follows.

First, the magnetic moment of 50 μL of each of the MPs suspensions has been measured using a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) and, using the manufacturer number of beads information, the saturation magnetic moment of a single bead has been calculated and the saturation field was determined.

Then, each type of beads was functionalized with antibodies. After this step, their kinetics of cell labeling and their aggregation were studied in parallel. Different concentrations of each type of MPs have been mixed in PBS and with 10^5 NS1/mL in PBS. For 2 to 3 h, regularly, 100 μL of these suspensions were poured into a well and let to sediment for 15 min. Pictures were then taken under optical microscope. For each cell-containing sample, the distribution of the number of beads per cell was evaluated by visual counting. For the samples without cells, hundreds of these photographs were analyzed with the ImageJ software. They were binarized before the software counted the number of pixels in each aggregate. From these data, the distribution of beads in aggregates was deduced.

Finally, Dynabeads MyOne Streptavidin T1 superparamagnetic have been chosen for the present study (Figure 5, results for the 4 other investigated types of beads can be found in Appendix A). They are 1 μm polymer beads containing maghemite clusters and have a sufficiently high moment that they can be attracted by a permanent magnet within 2 min, thus washing steps (required for mAbs functionalization of MPs) are extremely simple and quick. The saturation magnetic moment of a single bead has been calculated to be $2.1 \cdot 10^{-11}$ emu per bead and reached at a field of 700 mT but at 90 mT these beads already have an average magnetic moment of $1.6 \cdot 10^{-11}$ emu per bead (data not shown). They are easily functionalized with any kind of purified biotinylated antibodies with high efficiency, with the protocol described in Section 2.5. Moreover the number and size of bead aggregates in the commercial suspension were the lowest of the 5 studied MP types (93% of the objects in the suspension are composed of less than 7 beads, 99% less than 15 beads, the complete curve is presented on Figure 5f) and the distribution of beads per cell was satisfying with an average of roughly 50 MPs per cell (the distribution and the 100 magnification photographs are shown on Figure 5).

3.2.2. Chip Design

The objective is to find the most favorable conditions to discriminate labeled cells from aggregates. As described in details in the Section 3.1, the signals are determined by the dipolar field created by the detected object which depends mainly on the magnetic moment of the object and its height from the sensor. The expression of the dipolar field $H_{dip}^{\vec{}}$ created in B and sensed in C is given by Equation (2) where $\vec{\mu}$ is the magnetic moment of a bead and N is the number of beads of the detected object.

$$H_{dip}^{\vec{}} = 3\vec{BC} \cdot \frac{\vec{BC} \cdot N\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^5} - \frac{N\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^3} \quad (2)$$

On the Figure 5f, the distributions of beads in cells and in aggregates are given for our system. By using Equation (2), it can be calculated that, between the smallest object in negative samples (1 bead) and the most labeled cell (around 100 beads), the signal is multiplied by 100. Between a height of 1 μm from the sensor and of 10 μm from the sensor, the signal is divided by 1000. Thus, when the channel is directly placed at the top of the sensor, even a signal from a single bead (at 1 μm height) cannot be

discriminated from a signal coming from a labeled cell further away from the sensor in the channel, independently of the detection threshold.

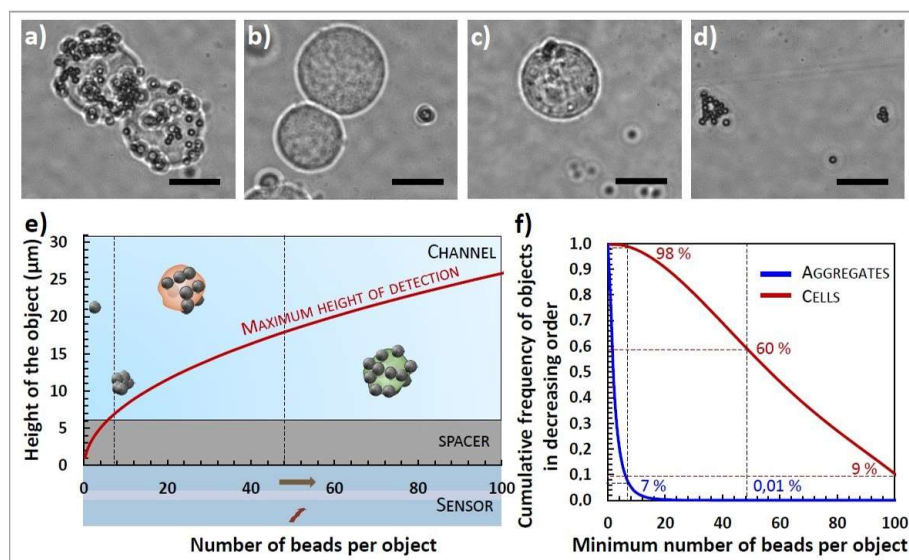


Figure 5. Labeling and aggregation study. Four sample photographs (magnification 100) were taken under optical microscope and illustrate beads repartition. (The scale bars represent 5 μm.) (a) Group of two NS1 cells labeled with Dynabeads MyOne functionalized with anti-CD138 mAbs. (b) Group of two NS1 cells after two hours-contact with Dynabeads MyOne functionalized with control IpaD-315 mAbs. (c) CHO cell after two hours-contact with Dynabeads MyOne functionalized with anti-CD138 mAb (d) Dynabeads MyOne functionalized with anti-CD138 mAbs in Phosphate Buffer Saline (PBS). (e) Adapted spacer layer thickness estimation. In this illustration, the detectivity is set to 2.2 μT. Relation between the number of beads covering an object and the maximum height at which it can be detected. Objects below the red curve are detectable while objects above are not. (f) Corresponding detectable population of cells and aggregates. Graph of the observed cumulative frequency of the number of MPs per NS1 cell and per aggregate in decreasing order. Estimation based on the study of 309 cells in a solution containing 10^5 NS1/mL and 23 μg/mL anti-CD138 functionalized MPs/mL after 2h-contact and of 18,630 aggregates in a suspension containing 23 μg/mL anti-CD138 in PBS.

Knowing the detectivity of the sensor (experimental characterizations are given on Table 2), the maximal distance from the sensor at which an object composed of N beads can be detected is deduced and plotted in the Figure 5. Above this distance, all the aggregates containing less than N MPs are undetectable. While 98% of NS1 are labeled with more than 7 beads, only 7% of aggregates are composed of more than 7 beads. This minimum number of beads seems to be a good discrimination factor. The Figure 5e shows that objects of 7 beads are undetectable from 6 μm above the sensor.

Adding a separation layer between the sensor and the bottom of the channel eliminates most of the nonspecific signals (from small aggregates and single beads) and improves the discrimination on the number of beads by reducing the importance of the height parameter. Indeed, between 7 and 16 μm height, the signal is divided by approximately 12 only. Without this supplementary layer, objects of small magnetization could still induce large amplitude signals that could be mistaken for labeled cells.

This study leads to the conclusion that the best configuration for our system is the addition of a 6 μm thick separation layer between the sensor and the channel. The thickness of the separation layer needs to be optimized for each couple bead/biological target, because it depends strongly on the expected moment per target and thus on the number of antigens expressed by the target.

3.3. Performance of the GMR Chip Test

Seven experiments (See Table 2 and Figure 6a) were realized on six days using 4 similar chips with different sample volumes ranging from 200 to 400 μL and the number of events was normalized to a volume of 1 mL. To avoid biased results, samples have been injected in the chip in different orders at each experiment and between two samples the chip was washed with deionized water and dried. For each experiment, the sensitivity and the noise level of the sensor have been measured and the detection thresholds were deduced (given in Table 2). In order to coherently treat data from these seven experiments, only signals above the highest detection threshold (2.2 μT) were considered.

Table 2. Experimental conditions of the seven experiments. The threshold of each experiment is defined as the lowest detectable signal (with a signal to noise ratio at 3). Results are given as a number of events above 2.2 μT detected per milliliter of sample. The average count is given with its standard deviation (SD) for each sample. Control samples are presented at the bottom of the table, separated from positive samples. The highest count in negative samples, in bold, is obtained for anti-CD138 beads in PBS for which the average value added to three standard deviations gives 3.6×10^3 counts.

		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Summary	
Sensor		Sensor A	Sensor B	Sensor C	Sensor D			Different	
Separation layer thickness		6.2 μm	6.4 μm	5.7 μm	5.5 μm			devices,	
Channel height		26.5 μm	27.4 μm	25.3 μm	23.1 μm			samples and	
Beads batch		1	2	3	4	5	5	conditions.	
Threshold (μT)		1.6	1.8	2.2	0.47	0.46	0.48	Same	
Sample volume (μL)		400	200	300	300	300	300	experimenters	
Cells	mAbs	Counts of signals above 2.2 microteslas per milliliter						Average \pm SD	
10^5 NS1	anti-CD138	12,123	14,700	10,367				$1.2 \times 10^4 \pm 1.8 \times 10^3$	
3×10^4 NS1	anti-CD138				3463	5173	6180	5070	$5.0 \times 10^3 \pm 9.7 \times 10^2$
10^4 NS1	anti-CD138				2867	1223	1927	1597	$1.9 \times 10^3 \pm 6.1 \times 10^2$
3×10^3 NS1	anti-CD138				467	630	517	607	$5.6 \times 10^2 \pm 6.6 \times 10^1$
10^3 NS1	anti-CD138				500	977	280	353	$5.3 \times 10^2 \pm 2.7 \times 10^2$
10^5 NS1	IpaD315	895	60	660	637	723	313	520	$5.4 \times 10^2 \pm 2.6 \times 10^2$
10^5 CHO	anti-CD138					690	380	367	$4.8 \times 10^2 \pm 1.5 \times 10^2$
\emptyset	anti-CD138	1665	375	2213	310				$1.1 \times 10^3 \pm 8.2 \times 10^2$

Between 60 and 2200 counts per milliliter were found in each type of negative control samples in PBS (14 measurements in total). Studying these results allow us to determine a count threshold characterizing the test. The count threshold above which the sample can be considered positive (the detection threshold) is calculated as the average of the values obtained for the negative test having the most counts (thus, the anti-CD138 beads) added to three times their standard deviation. This method concludes to an average non-specific count of 1.1×10^3 counts per milliliter and a detection count threshold of 3.6×10^3 counts per milliliter.

Looking at the positive sample results, this threshold corresponds to a concentration between 1 and 3×10^4 NS1 per milliliter.

3.4. ELISA Test Sensitivity

The ELISA test was repeated in three independent experiments in order to compare its detection limit to the one of the GMR sensor. Results are presented in Figure 6b. For this 5 h-test in PBS suspensions, the detection limit (the lowest concentration at which the test can determine positivity of the sample) was found equal to 2.0×10^4 NS1/mL $\pm 1.8 \times 10^4$ while the quantification limit (the lowest concentration at which the test can give a correct estimation of the sample concentration) was found at 6.7×10^4 NS1/mL $\pm 2.9 \times 10^4$.

3.5. Flow Cytometry Results

The number of NS1 cells was evaluated by flow cytometry using a specific monoclonal antibody against the CD138 surface molecule. The living cells were selected by size and cell granularity and the number of CD138+ cells in each sample was evaluated by comparison with cells incubated with buffer alone. As can be seen in Figure 6c, the evaluation of the number of positive cells for the CD138 marker is possible up to a cell concentration in the sample equal to 3×10^3 cells/mL.

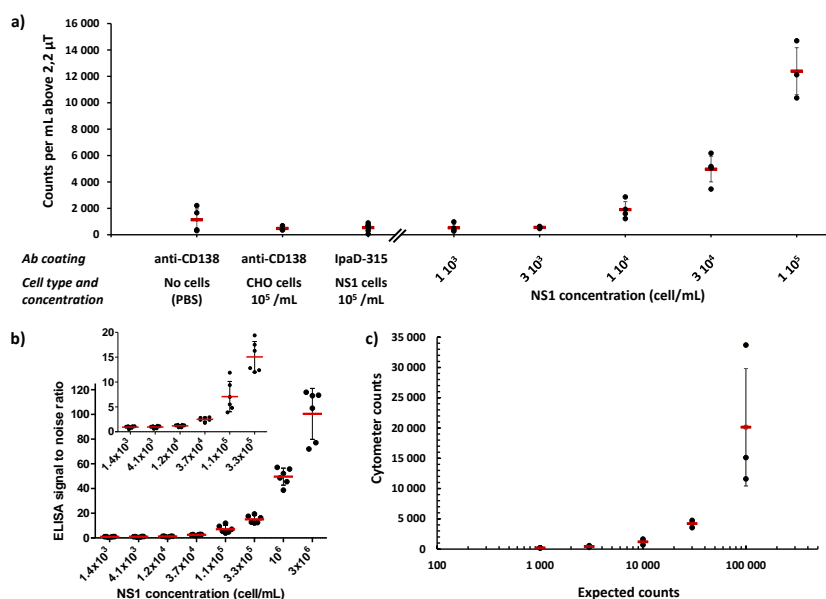


Figure 6. Experimental results of the three tests. All were performed in different days, thus the same samples were not tested with the three techniques. (a) Experimental results of the GMR test. Red dashes represent the mean of the experiments. Error bars represent standard deviations from the experiments. (b) Experimental results of the ELISA tests. Different concentrations of NS1 cells in PBS were detected using the homologous sandwich ELISA involving anti-CD138 mAb as capture and tracer antibody in a 5 h sequential format. The signal to noise ratio was calculated from the mean of eight measurements of PBS alone. Red dashes represent the mean of the three independent experiments, each performed in duplicate. Error bars represent standard deviations from the three experiments. The insert shows the low concentration part of the curve. (c) Experimental results of flow cytometry presented as counts per milliliter for each concentration. Red dashes represent the mean of the three independent experiments. Error bars represent standard deviations from the three experiments.

4. Conclusions

In this article, the different steps of the conception of a magnetoresistive chip cell-counter were detailed. This detection technique has a great potential. The production, use and integrability of GMR sensors are easy and the tool allows for the detection of targets one by one. This test was evaluated regarding several essential qualities of diagnostic tools (sensitivity, specificity, reproducibility and duration) on a biological model, murine myeloma cells immunocaptured by commercial magnetic beads of 1 μm in diameter. The reached sensitivity of about 10^4 cells/mL is equivalent to that of an ELISA test realized with the same reagents (NS1 cells, mAbs, buffer ...). Our test is simpler to perform than an ELISA test. Indeed, the GMR test can be performed within 2h30 (2 h of labeling as assessed by our kinetic study, briefly described in Appendix A and 30 min/mL of sample for the test) without any washing steps, while the compared ELISA test requires several washing steps. Data treatment can be done in a few minutes for ELISA test and can be integrated in the acquisition chain and done in real time for the GMR test. One can note that both techniques can benefit from large parallelization of tests. Moreover, the time of the GMR test can be further reduced by increasing the flow rate in the channel.

The labelling processes strongly depends on the target, the beads and the biological probe and other groups reported times between 30 and 180 min [51,53,57]. This time will have to be optimized on the final system, in the real biological sample.

Flow cytometry, although not optimized to give absolute cell counts, have a sensitivity ten times lower than the GMR test. However, this method is more complicated, with washing steps, causing loss of cells and thus discrepancies in counts. The Figure 7 shows the extrapolated number of cells counted by both techniques in positive samples of 1 mL as a function of the expected counts. The agreement between the two techniques is remarkably good for all concentrations except at 10^3 NS1/mL. Our technique however, presents the interest that the count of signals can be automated while flow cytometry data treatment requires an expert.

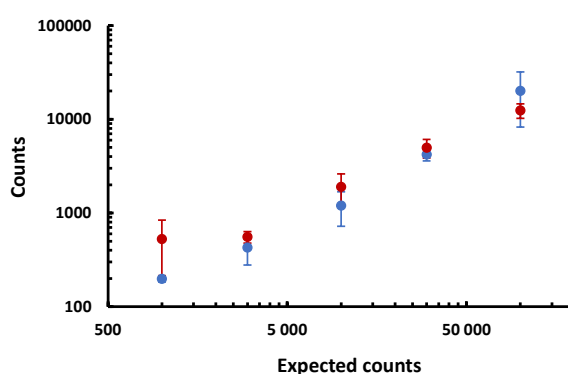


Figure 7. Experimental results of flow cytometry (in blue) compared with experimental results of the GMR test (in red). Mean values and standard deviations are represented.

The relatively high limit of detection of some 10^4 cells/mL is due to two main phenomena. First, some specific events are missed. Indeed, some less efficiently labeled cells are flowing high in the channel and cannot be detected specifically. Secondly, the detection count threshold has a high value. This can be explained both by the number of beads aggregates, increasing the average number of non-specific signals and by the variability of experimental parameters, increasing the standard deviation of the number of non-specific signals. These uncertainties rise from the use of 5 distinct batches of functionalized beads for the experiment, the random order in which the samples were passed and the involuntarily fluctuations in channel geometry.

This study shows the importance to take into account the biological parameters (antigen distribution, labeling efficiency, cell survival, matrix effect, etc.) in the test evaluation. The high detection count threshold value demonstrates the crucial importance of having negative controls and to repeat experiments in different conditions several times in order to define correctly performances of such technologies. The development of diagnostic tests are based on these two pillars (physical and biological parameters) and correct definitions of performances of a test should systematically integrate these cross-cutting aspects. Here, the focus was set on a rigorous evaluation of non-specific signals measured by the GMR sensor. The study showed that these non-specific signals were due to the detection of beads aggregates.

To lower the detection threshold without complicating the device, the challenge is to diminish drastically the number and the sizes of the MP aggregates. As a matter of fact, decreasing the number of beads in aggregates would enable great changes in the chip design. The separation layer, added to reduce the impact of non-specific events, could be thinned and thus less efficiently labeled cells would be easier to detect. A better understanding of these aggregation phenomena and development of solutions to reduce the number of these non-specific events will help to reach a better reproducibility and sensitivity.

The elimination of aggregates can be performed by microfluidics sorting techniques relying on hydrodynamic or magnetodynamic forces [61–65] but this would necessarily waste a certain amount of expensive mAbs-coated beads. Another way to deal with these beads suspensions instabilities would be to address directly the cause by a better design of the magnetic beads, such as adding a PEG coating [66].

The real solution may lie in designing magnetic beads tuned especially for this application and thus, to continue the development of this diagnosis tool, the natural next step should be to add chemistry as a third project pillar.

Author Contributions: Conceptualization, M.G., F.-D.D., C.F., C.F.-T., S.S. and G.J.-L.; Data curation, M.G. and C.F.-T.; Formal analysis, M.G., C.F.-T. and G.J.-L.; Funding acquisition, E.E., S.S. and G.J.-L.; Investigation, M.G., F.-D.D., A.W. and C.F.-T.; Methodology, F.-D.D., C.F., C.F.-T., S.S. and G.J.-L.; Project administration, G.J.-L.; Resources, G.C., M.P. and E.P.; Software, P.B., M.T. and C.F.; Supervision, C.F., C.F.-T., S.S. and G.J.-L.; Validation, C.F.-T. and G.J.-L.; Visualization, M.G.; Writing—original draft, M.G.; Writing—review & editing, F.-D.D., A.W., C.F., C.F.-T., S.S. and G.J.-L.

Funding: This research was funded by the Direction Générale de l’Armement, the Ile de France region and its DIM-ELICIT program and the CEA transverse programs “Techno-Santé” and “PTC Instrumentation et Détection”.

Acknowledgments: We are greatly indebted to Bakhos Jneid and Karine Devilliers who produced the recombinant IpaD protein and the monoclonal antibody IpaD315. We would like to thank Gérald Le Goff and Dominique Duet for their regular help with technical issues. We are grateful to Olivier Limousin, Antoine Pallandre, Anne-Marie Haghiri-Gosnet, Auélie Solignac and Hervé Volland for fruitful scientific exchanges.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

BSA	Bovine Serum Albumine
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GMR	Giant Magneto-Resistance
mAb	Monoclonal antibody
MP	Magnetic Particle
PBS	Phosphate buffer saline
PDMS	Polydimethylsiloxane

Appendix A. Magnetic Particles Aggregation Study

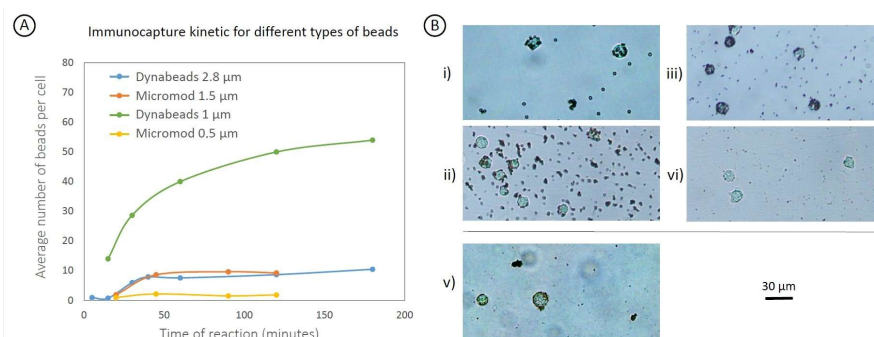


Figure A1. (A) Kinetic of NS1 labeling for 4 types of microbeads. (B) 20 magnification photographs of NS1 cells incubated 2 h with: (i) Dynabeads 2.8 μm (ii) Micromod 1.5 μm (iii) Dynabeads 1 μm (iv) Micromod 0.5 μm (v) Adembeads 200 nm.

mAbs-functionalized 200 nm carboxyl-Adembeads (Ademtech[®]), 500 nm streptavidin nanomag[®]-D (Micromod), 1 μm Dynabeads[™] MyOne[™] Streptavidin T1 (Invitrogen[™]), 1.5 μm streptavidin sicastar[®]-M (Micromod) and 2.8 μm Dynabeads[™] M-280 Tosylactivated (Invitrogen[™])

suspensions were analyzed in terms of aggregate distribution (data not shown). Then, cell immunocapture kinetic studies were realized with an optical microscope. Data from 200 nm beads were hardly exploited but it was clear that beads aggregated considerably while no excessive labeling was visible at cell surface (Figure A1B(v)). The other 4 types of MPs gave quantified results presented on Figure A1 as plots of average number of beads per cell against time. The 500 nm-diameter Micromod beads labelled poorly the cells after 2 h. 1.5 μm diameter Micromod beads labelled the cells correctly but aggregates were far too numerous for those beads to be of any interest. The best options were the two kinds of DynabeadsTM. The estimation of number and size of aggregates for these beads showed that 1 μm beads seemed to form labeled cells more distinguishable from beads aggregates than the 2.8 ones. However, to confirm that, there were attempts to decrease the number of aggregates for 2.8 μm beads as they reached the maximum cell labeling quicker. They were sonicated for 30 s to 1 minute for 1 to 3 times before use with no conclusive results. Then, they were vortexed and sonicated alternatively 3 times with cycles of 2 and 1 min respectively. Finally they were added to several detergent alone or in combinations at 0.1% each (SDS (sodium dodecyl sulfate), tween 20, triton X-100, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)) either in PBS or in deionized water before being submitted to the 3 cycles of sonication-vortices described above. While most of these attempts remained unsuccessful, the suspension of beads in deionized water containing all detergents and the suspension in deionized water containing SDS and tween 20 showed significant improvements: the percentage of single beads improved from 66% in the suspension in PBS without detergent to 90% and 84% respectively. Once this observation was done, the cell survival was evaluated in the presence of different detergent concentrations ranging from 0.01% to 1%. All cells were lysed after 2 h contact with all these detergent concentrations. DynabeadsTM of 1 μm were thus the optimum and detergent use was abandoned. Sonication and vortex did not improve their aggregation.

References

1. Bialy, L.; Mlynarczuk-Bialy, I. *Advances in Biomedical Research—Selected Topics*; Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.: Lublin, Poland, 2018.
2. Cohen, S.J.; Punt C.J.; Iannotti N.; Saidman B.H.; Sabbath K.D.; Gabrail N.Y.; Picus J.; Morse M.; Mitchell E.; Miller M.C.; et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3213–3221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Giuliano, M.; Giordano, A.; Jackson, S.; Hess, K.R.; De Giorgi, U.; Mego, M.; Handy, B.C.; Ueno, N.T.; Alvarez, R.H.; De Laurentiis, M.; et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sinha, M.; Jupe, J.; Mack, H.; Coleman, T.P.; Lawrence, S.M.; Fraley, S.I. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00089–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R.M.; Barregard, L.; Bhutta, Z.A.; Brenner, H.; Dicker, D.J.; Chimed-Orchir, O.; Dandona, R.; Dandona, L.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 524–548.
6. Fulwyler, M.J. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science* **1965**, *150*, 910–911. [[CrossRef](#)]
7. Aebischer, D.; Bartusik, D.; Tabarkiewicz, J. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 434–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Brown, M.; Wittwer, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1221–1229.
9. Bakke, A.C. Clinical Applications of Flow Cytometry. *Lab. Med.* **2000**, *31*, 97–104. [[CrossRef](#)]
10. Wood, B.L. Principles of Minimal Residual Disease Detection for Hematopoietic Neoplasms by Flow Cytometry. *Cytom. Part B* **2016**, *90*, 47–53. [[CrossRef](#)]
11. Chernecky, C.C.; Berger, B.J. *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*; Elsevier Health Sciences: Saint Louis, MO, USA, 2012.

12. Féraudet-Tarisse, C.; Vaisanen-Tunkelrott, M.L.; Moreau, K.; Lamourette, P.; Créminon, C.; Volland, H. Pathogen-free screening of bacteria-specific hybridomas for selecting high-quality monoclonal antibodies against pathogen bacteria as illustrated for *Legionella pneumophila*. *J. Immunol. Methods* **2013**, *391*, 81–94. [[CrossRef](#)]
13. Gan, S.D.; Patel, K.R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, e12. [[CrossRef](#)]
14. Piyasena, M.E.; Graves, S.W. The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab Chip* **2014**, *14*, 1044–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gong, Y.; Fan, N.; Yang, X.; Peng, B.; Jiang, H. New advances in microfluidic flow cytometry. *Electrophoresis* **2018**, *40*, 1212–1229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mendez-Gonzalez, D.; Lopez-Cabarcos, E.; Rubio-Retama, J.; Laurenti, M. Sensors and bioassays powered by upconverting materials. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 66–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. MagArray. Available online: <http://www.magarray.com/> (accessed on 5 February 2019).
18. Zepto. Available online: <http://www.zeptolife.com/> (accessed on 5 February 2019).
19. Magnomics. Available online: <http://www.magnomics.pt/> (accessed on 5 February 2019).
20. Krishna, V.D.; Wu, K.; Perez, A.M.; Wang, J.P. Giant Magnetoresistance-based Biosensor for Detection of Influenza A Virus. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 400. [[CrossRef](#)]
21. Ferguson, B.S.; Buchsbaum, S.F.; Wu, T.T.; Hsieh, K.; Xiao, Y.; Sun, R.; Soh, R.T. Genetic analysis of H1N1 influenza virus from throat swab samples in a microfluidic system for point-of-care diagnostics. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9129–9135. [[CrossRef](#)]
22. Pihíková, D.; Kasák, P.; Tkac, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chem.* **2015**, *13*, 636–655. [[CrossRef](#)]
23. Serrate, D.; De Teresa, J.M.; Marquina, C.; Marzo, J.; Saurel, D.; Cardoso, F.A.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Ibarra, M.R. Quantitative biomolecular sensing station based on magnetoresistive patterned arrays. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 206–212. [[CrossRef](#)]
24. Fermon, C.; Van de Voorde, M. *Nanomagnetism, Applications and Perspectives*; Wiley: Weinheim, Germany; 2017.
25. Lin, G.; Makarov, D.; Schmidt, O.G. Magnetic sensing platform technologies for biomedical applications. *Lab Chip* **2017**. [[CrossRef](#)]
26. Wang, T.; Yang, Z.; Lei, C.; Lei, J.; Zhou, Y. An integrated giant magnetoimpedance biosensor for detection of biomarker. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 338–344. [[CrossRef](#)]
27. Boyle, D.S.; Hawkins, K.R.; Steele, M.S.; Singhal, M.; Cheng, X. Emerging technologies for point-of-care CD4 T-lymphocyte counting. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Barroso, T.G.; Martins, R.C.; Fernandes, E.; Cardoso, S.; Rivas, J.; Freitas, P.P. Detection of BCG bacteria using a magnetoresistive biosensor: A step towards a fully electronic platform for tuberculosis point-of-care detection. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 259–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lange, J.; Kötz, R.; Haller, A.; Trahms, L.; Semmler, W.; Weitschies, W. Magnetorelaxometry—A new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 381–383. [[CrossRef](#)]
30. Yang, T.Q.; Abe, M.; Horiguchi, K.; Enpuku, K. Detection of magnetic nanoparticles with ac susceptibility measurement. *Phys. C* **2004**, *412–414*, 1496–1500. [[CrossRef](#)]
31. Ludwig, F.; Heima, E.; Mä useleina, S.; Eberbeck, D.; Schilling, M. Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 690–695. [[CrossRef](#)]
32. Denmark, D.J.; Bustos-Perez, X.; Swain, A.; Phan, M.H.; Mohapatra, S.; Mohapatra, S.S. Readiness of Magnetic Nanobiosensors for Point-of-Care Commercialization. *J. Electron. Mater.* **2019**, *48*, 4749–4761. [[CrossRef](#)]
33. Guo, L.; Yang, Z.; Zhi, S.; Feng, Z.; Lei, C.; Zhou, Y. A sensitive and innovative detection method for rapid C-reactive proteins analysis based on a micro-fluxgate sensor system. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194631. [[CrossRef](#)]
34. Pekas, N.; Porter, M.D. Giant magnetoresistance monitoring of magnetic picodroplets in an integrated microfluidic system. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 4783–4785. [[CrossRef](#)]

35. Loureiro, J.; Ferreira, R.; Cardoso, S.; Freitas, P.P.; Germano, J.; Fermon, C.; Arrias, G.; Pannetier-Lecoeur, M.; Rivadulla, F.; Rivas, J. Toward a magnetoresistive chip cytometer: Integrated detection of magnetic beads flowing at cm/s velocities in microfluidic channels. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95*, 034104. [[CrossRef](#)]
36. Loureiro, J.; Andrade, P.Z.; Cardoso, S.; da Silva, C.L.; Cabral, J.M.; Freitas, P.P. Magnetoresistive chip cytometer. *Lab Chip* **2011**, *11*, 2255–2261. [[CrossRef](#)]
37. Walt, D.R. Optical methods for single molecule detection and analysis. *Anal. Chem.* **2013**, *83*, 1258–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Helou, M.; Reisbeck, M.; Tedde, S.F.; Richter, L.; Bär, L.; Bosch, J.J.; Stauber, R.H.; Quandt, E.; Hayden, O. Time-of-flight magnetic flow cytometry in whole blood with integrated sample preparation. *Lab Chip* **2013**, *13*, 1035–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Muluneh, M.; Issadore, D. Microchip-based detection of magnetically labeled cancer biomarkers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Murali, P.; Niknejad, A.M.; Boser, B.E. CMOS Microflow Cytometer for Magnetic Label Detection and Classification. *IEEE J. Solid-State Circuits* **2017**, *52*, 543–555. [[CrossRef](#)]
41. Giouroudi, I.; Kokkinis, G. Recent Advances in Magnetic Microfluidic Biosensors. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Fodil, K.; Denoual, M.; Dolabdjian, C.; Treizebre, A.; Senez, V. In-flow detection of ultra-small magnetic particles by an integrated giant magnetic impedance sensor. *Appl. Phys. Lett.* **2016**, *108*, 173701. [[CrossRef](#)]
43. García-Arribas, A.; Martínez, F.; Fernández, E.; Ozaeta, I.; Kurlyandskaya, G.V.; Svalov, A.V.; Berganzo, J.; Barandiaran, J.M. GMI detection of magnetic-particle concentration in continuous flow. *Sens. Actuators A* **2011**, *172*, 103–108. [[CrossRef](#)]
44. Blanc-Béguin, F.; Nabily, S.; Gieraltowski, J.; Turzo, A.; Querellou, S.; Salaun, P. Cytotoxicity and GMI bio-sensor detection of maghemite nanoparticles internalized into cells. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 192–197. [[CrossRef](#)]
45. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497. [[CrossRef](#)]
46. Delahaut, P. Immunisation—Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods* **2017**, *116*, 4–11. [[CrossRef](#)]
47. Giouroudi, I.; Hristoforou, E. Perspective: Magnetoresistive sensors for biomedicine. *J. Appl. Phys.* **2018**, *124*, 030902. [[CrossRef](#)]
48. Lenz, J.E. A Review of Magnetic Sensors. *Proc. IEEE* **1990**, *78*, 973–989. [[CrossRef](#)]
49. Nabaei, V.; Chandrawati, R.; Heidari, H. Magnetic biosensors: Modelling and simulation. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *103*, 69–86. [[CrossRef](#)]
50. Pannetier-Lecoeur, M. *Superconducting-Magnetoresistive Sensor: Reaching the Femtotesla at 77 K*; Habilitation à Diriger des Recherches en Physique, Condensed Matter, Université Pierre et Marie Curie–Paris VI: Paris, France, 2010.
51. Issadore, D.; Chung, J.; Shao, H.; Liong, M.; Ghazani, A.A.; Castro, C.M.; Weissleder, R.; Lee, H. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-Hall detector. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 141ra92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Issadore, D.; Chung, H.J.; Chung, J.; Budin, G.; Weissleder, R.; Lee, H. μ Hall chip for sensitive detection of bacteria. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1224–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chácharo, A.; Martins, M.; Barnsley, L.C.; Taouallah, A.; Fernandes, J.; Silva, B.F.B.; Cardoso, S.; Diéguez, L.; Espiña, B.; Freitas, P.P. Enhanced magnetic microcytometer with 3D flow focusing for cell enumeration. *Lab Chip* **2018**, *18*, 2593–2603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Reisbeck, M.; Richter, L.; Helou, M.J.; Arlinghaus, S.; Anton, B.; van Dommelen, I.; Nitzsche, M.; Baßler, M.; Kappes, B.; Friedrich, O.; et al. Hybrid integration of scalable mechanical and magnetophoretic focusing for magnetic flow cytometry. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974–4984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sierocki, R.; Jneid, B.; Rouaix, A.; Plaisance, M.; Féraudet-Tarisse, C.; Maillère, B.; Nozach, H.; Simon, S. An antibody targeting type III secretion system induces broad protection against Salmonella and Shigella infections. Unpublished manuscript, 2019.

57. Reisbeck, M.; Helou, M.J.; Richter, L.; Kappes, B.; Friedrich, O.; Hayden, O. Magnetic fingerprints of rolling cells for quantitative flow cytometry in whole blood. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Lee, C.P.; Lai, M.F.; Huang, H.T.; Lin, C.W.; Wei, Z.H. Wheatstone bridge giant-magnetoresistance based cell counter. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *57*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Pannetier, M.; Fermon, C.; Le Goff, G.; Simola, J.; Kerr, E. Low noise magnetoresistive sensors for current measurement and compasses. *J. Magn. Magn Mater.* **2007**, *316*, 246–248. [[CrossRef](#)]
60. Li, G.; Wang, S.X.; Sun, S. Model and Experiment of Detecting Multiple Magnetic Nanoparticles as Biomolecular Labels by Spin Valve Sensors. *IEEE Trans. Magn.* **2004**, *40*, 3000–3002. [[CrossRef](#)]
61. Huang, L.R.; Cox, E.C.; Austin, R.H.; Sturm, J.C. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science* **2004**, *304*, 987–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. El Hasnia, A.; Göbbels, K.; Thiebes, A.L.; Bräunig, P.; Mokwa, W.; Schnakenberg, U. Focusing and sorting of particles in spiral microfluidic channels. *Procedia Eng.* **2011**, *25*, 1197–1200. [[CrossRef](#)]
63. Salafi, T.; Zeming, K.K.; Zhang, Y. Advancements in microfluidics for nanoparticle separation. *Lab Chip* **2017**, *17*, 11–33. [[CrossRef](#)]
64. McGrath, J.; Jimenez, M.; Bridle, H. Deterministic lateral displacement for particle separation: A review. *Lab Chip* **2014**, *14*, 4139–4158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pamme, N.; Manz, A. On-Chip Free-Flow Magnetophoresis: Continuous Flow Separation of Magnetic Particles and Agglomerates. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7250–7256. [[CrossRef](#)]
66. Illés, E.; Tombácz, E.; Szekeres, M.; Tóth, I.Y.; Szabó, A.; Iván, B. Novel carboxylated PEG-coating on magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *380*, 132–139. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Bibliographie

- [1] Shawn D. Carrigan, George Scott, and Maryam Tabrizian. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clinical Chemistry*, 50(8) :1301 – 1314, 2004.
- [2] Karina T. O. S. Jorge et al. Characterization of microrna expression profiles and identification of potential biomarkers in leprosy. *J. of Clinical Microbiology*, 55 :1516 – 1525, May 2017.
- [3] Fouzi Mouffouk et al. New generation of electrochemical immunoassay based on polymeric nanoparticles for early detection of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 12 :3037 – 3047, Apr 2017.
- [4] Che Nor Adlia Enche Ady et al. Metabolomic-guided discovery of Alzheimer’s disease biomarkers from body fluid. *Journal of Neuroscience Research*, Mar 2017.
- [5] G. F. Sharkas et al. Colorectal cancer in Jordan : survival rate and its related factors. *J Oncol.*, Mar 2017.
- [6] Anastasia Katsarou et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3 :17016, Mar 2017.
- [7] Ana Filipa Brito et al. Targeting hepatocellular carcinoma : what did we discover so far? *Oncology Reviews*, 10(302) :47 – 53, Aug 2016.
- [8] C Niederau and G. Strohmeyer. Strategies for early diagnosis of haemochromatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 14(3) :217 – 221, Mar 2002.
- [9] R. Michel et al. Actualités sur les diarrhées aiguës liées aux déploiements hors métropole. *Médecine et Armées*, 46 :5 – 12, 2018.
- [10] U-P. Rohr et al. The value of in vitro diagnostic testing in medical practice : A status report. *Plos One*, 11, Mar 2016.
- [11] Auriane Nadal. *Biomarqueurs et dispositifs médicaux de diagnostic in vitro : développement, cadre juridique et éthique*. PhD thesis, Faculté de Pharmacie de Montpellier – Montpellier, 2017.
- [12] Bob Olsson et al. Csf and blood biomarkers for the diagnosis of alzheimer’s disease : a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15 :673 – 684, Jun 2016.
- [13] In Seok Yang et al. Idbd : Infectious disease biomarker database. *Nucleic Acids Research*, 36 :D455 – D460, Jan 2008.
- [14] Stéphanie Simon and Eric Ezan. Ultrasensitive bioanalysis : current status and future trends. *Bioanalysis*, 9(9) :753 – 764, 2017.
- [15] Cara S Kosack, Anne-Laure Page, and Paul R Klatser. A guide to aid the selection of diagnostic tests. *Bull World Health Organ*, 95 :639 – 645, 2017.
- [16] Hyungsoon Im, Hakho Lee, and Cesar M. Castro. Challenges influencing next generation technologies for precision medicine. *Expert Rev Precis Med Drug Dev.*, 1(2) :121 – 123, 2016.
- [17] Christina Fitzmaurice et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015 a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*, 3 :524 – 548, Apr 2017.

- [18] Beni V Mak W C and Turner A P F. Lateral-flow technology : From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79 :297 – 305, 2017.
- [19] Can Dincer et al. Multiplexed point-of-care testing – xpoct. *Trends in Biotechnology*, 35(8) :728 – 742, Aug 2017.
- [20] Yanling Song et al. Recent progress in microfluidics-based biosensing. *Analytical Chemistry*, 91 :388 – 404, 2019.
- [21] Sabine Borgmann, Albert Schulte, Sebastian Neugebauer, and Wolfgang Schuhmann. Amperometric biosensors. In Richard C. Alkire, Dieter M. Kolb, and Jacek Lipkowski, editors, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, chapter 1, pages 1 – 83. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011.
- [22] Frank B. Myers and Luke P. Lee. Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip*, 8 :2015 – 2031, 2008.
- [23] Dominika Pihřková, Peter Kasák, and Jan Tkac. Glycoprofiling of cancer biomarkers : Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open Chemistry*, 13 :636 – 655, 2015.
- [24] Karolina Dziabowska, Elzbieta Czaczyk, and Dawid Nidzworski. Detection methods of human and animal influenza virus—current trends. *Biosensors*, 8, 2018.
- [25] Yanli Gong Na Fan Xu Yang Bei Peng Hai Jiang. New advances in microfluidic flow cytometry. *Electrophoresis*, 0 :1 – 18, Sep 2018.
- [26] Sung-Yi Yang et al. A cell counting/sorting system incorporated with a microfabricated flow cytometer chip. *Meas. Sci. Technol.*, 17 :2001 – 2009, Jun 2006.
- [27] Jin Akagi et al. Microflow cytometry in studies of programmed tumor cell death. *Sensors and Actuators B*, 189 :2 – 10, 2013.
- [28] David S. Boyle, Kenneth R. Hawkins, Matthew S. Steele, Mitra Singhal, and Xuanhong Cheng. Emerging technologies for point-of-care cd4 t-lymphocyte counting. *Trends in Biotechnology*, 30 :45 – 54, Jan 2012.
- [29] Jian Chen et al. Microfluidic impedance flow cytometry enabling high-throughput single-cell electrical property characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 :9804 – 9830, 2015.
- [30] N. Gözde Durmuş, Richard L. Lin, Mariel Kozberg, Deniz Dermici, Ali Khademhosseini, and Utkan Demirci. *Acoustic-Based Biosensors*, pages 1–15. Springer US, Boston, MA, 2013.
- [31] Hakho Lee, Tae-Hyun Shin, Jinwoo Cheon, and Ralph Weissleder. Recent developments in magnetic diagnostic systems. *Chemical Reviews*, 115 :10690 – 10724, 2015.
- [32] Daniel J. Denmark et al. Readiness of magnetic nanobiosensors for point-of-care commercialization. *Journal of Electronic Materials*, 48 :4749 – 4761, Aug 2019.
- [33] Michael Helou, Mathias Reisbeck, Sandro F. Tedde, Lukas Richter, Ludwig Bär, Jacobus J. Bosch, Roland H. Stauber, Eckhard Quandt, and Oliver Hayden. Time-of-flight magnetic flow cytometry in whole blood with integrated sample preparation. *Lab on a Chip*, 13 :1035 – 1038, Jan 2013.
- [34] Q A Pankhurst, J Connolly, S K Jones, and J Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Appl. Phys.*, 36 :167 – 181, Jun 2003.
- [35] Erzsébet Illés et al. Novel carboxylated peg-coating on magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380 :132 – 139, Apr 2015.
- [36] B. Mehdaoui, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, L. Lacroix, M. Gougeon, B. Chaudret, and M. Respaud. Optimal size of nanoparticles for magnetic hyperthermia : A combined theoretical and experimental study. *Advanced Functional Materials*, 21 :4573 – 4581, 2011.
- [37] <https://www.sekisuidiagnostics.com/>.

- [38] <http://chembio.com/>.
- [39] <http://www.meridianbioscience.eu/>.
- [40] <https://microgenbioproducts.com/>.
- [41] <http://www.quidel.com/>.
- [42] <https://www.thermofisher.com/>.
- [43] <https://www.fluidigm.com/products>.
- [44] Paul Yager, Thayne Edwards, Elain Fu, Kristen Helton, Kjell Nelson, Milton R. Tam, and Bernhard H. Weigl. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442 :412 – 418, Jul 2006.
- [45] Hervé Boutal, Thierry Naas, Karine Devilliers, Saoussen Oueslati, Laurent Dortet, Sandrine Bernabeu, Stéphanie Simon, and Hervé Volland. Development and validation of a lateral flow immunoassay for the rapid detection of ndm-producing enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 55, Jul 2017.
- [46] Stéphanie Simon, Christian Demeure, Patricia Lamourette, Sofia Filali, Marc Plaisance, Christophe Créminon, Hervé Volland, and Elisabeth Carniel. Fast and simple detection of yersinia pestis applicable to field investigation of plague foci. *Plos one*, 8, Jan 2013.
- [47] Miroslav Pohanka and Petr Skládal. Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of Applied Biomedecine*, 6 :57 – 64, 2008.
- [48] J. Lange et al. Magnetorelaxometry—a new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252 :381 – 383, 2002.
- [49] Tong Qing Yang, Masaya Abe, Kenji Horiguchi, and Keiji Enpuku. Detection of magnetic nanoparticles with ac susceptibility measurement. *Physica C*, 412 – 414 :1496 – 1500, 2004.
- [50] Frank Ludwig, Erik Heima, Sasha Mä useleina, Dietmar Eberbeckb, and Meinhard Schilling. Magneto-relaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293 :690 – 695, 2005.
- [51] Lei Guo et al. A sensitive and innovative detection method for rapid c-reactive proteins analysis based on a micro-fluxgate sensor system. *PLoS One*, 13, Mar 2018.
- [52] Yi-Ting Chen, Arati G. Kolhatkar, Oussama Zenasni, Shoujun Xu, and T. Randall Lee. Biosensing using magnetic particle detection techniques. *Sensors*, 17, 2017.
- [53] Arezou Ghazani, Cesar Castro, Rostic Gorbatov, Hakho Lee, and Ralph Weissleder. Sensitive and direct detection of circulating tumor cells by multimarker μ -nuclear magnetic resonance. *Neoplasia*, 14 :388 – 395, May 2012.
- [54] Cesar M. Castro et al. Miniaturized nuclear magnetic resonance platform for detection and profiling of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 14 :14 – 23, Jan 2014.
- [55] F. Blanc-Béguin, S. Nabily, J. Gieraltowski, A. Turzo, S. Querellou, and P.Y. Salaun. Cytotoxicity and gmi bio-sensor detection of maghemite nanoparticles internalized into cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321 :192 – 197, 2009.
- [56] David Issadore et al. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-hall detector. *Science Translational Medicine*, 4, Jul 2012.
- [57] Rita Soares et al. Go with the flow : advances and trends in magnetic flow cytometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 :1839 – 1862, Mar 2019.
- [58] Ioanna Giouroudi and Evangelos Hristoforou. Perspective : Magnetoresistive sensors for biomedicine. *Journal of Applied Physics*, 124, 2018.
- [59] James E. Lenz. A review of magnetic sensors. *Proceedings of the IEEE*, 78 :973 – 989, Jun 1990.
- [60] Vahid Nabaei, Rona Chandrawati, and Hadi Heidari. Magnetic biosensors : Modelling and simulation. *Biosensors and Bioelectronics*, 103 :69 – 86, Apr 2018.

- [61] Myriam Pannetier-Lecoecur. *Superconducting-magneto-resistive sensor : Reaching the femtotesla at 77 K*. Habilitation à diriger des recherches en physique, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, 2010.
- [62] Gungun Lin, Denys Makarov, and Oliver G. Schmidt. Magnetic sensing platform technologies for biomedical applications. *Lab on a Chip*, Apr 2017.
- [63] Melaku Muluneh and David Issadore. Microchip-based detection of magnetically labeled cancer biomarkers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66 :101 – 109, Feb 2014.
- [64] S. Cardoso et al. Challenges and trends in magnetic sensor integration with microfluidics for biomedical applications. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 50 :213001, Apr 2017.
- [65] Natalia V. Guteneva, Sergey L. Znoyko, Alexey V. Orlov, Maxim P. Nikitin, and Petr I. Nikitin. Rapid lateral flow assays based on the quantification of magnetic nanoparticle labels for multiplexed immunodetection of small molecules : application to the determination of drugs of abuse. *Microchimica Acta*, 186 :621, Sep 2019.
- [66] D. Serrate et al. Quantitative biomolecular sensing station based on magneto-resistive patterned arrays. *Biosensors & Bioelectronics*, 35 :206 – 212, 2012.
- [67] Huaming Lei, Kan Wang, Xiaojun Ji, and Daxiang Cui. Contactless measurement of magnetic nanoparticles on lateral flow strips using tunneling magneto-resistance (tmr) sensors in differential configuration. *Sensors*, 16 :2130, 2016.
- [68] Sunjong Oh et al. Analytes kinetics in lateral flow membrane analyzed by ctni monitoring using magnetic method. *Sensors and Actuators B*, 160 :747 – 752, 2011.
- [69] Alexandre Chicharo, Filipe Cardoso, Susana Cardoso, and Paulo P. Freitas. Dynamical detection of magnetic nanoparticles in paper microfluidics with spin valve sensors for point-of-care applications. *IEEE Transactions on Magnetics*, 50(11) :5102204, Nov 2014.
- [70] Claude Fermon and Marcel Van de Voorde. *Nanomagnetism, applications and perspectives*. Wiley, 2017.
- [71] Teresa G. Barroso et al. Detection of bcg bacteria using a magneto-resistive biosensor : A step towards a fully electronic platform for tuberculosis point-of-care detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 100 :259 – 265, 2018.
- [72] DA Hall, RS Gaster, K Makinwa, SX Wang, and B Murmann. A 256 pixel magneto-resistive biosensor microarray in 0.18um cmos. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 48 :1290 – 1301, May 2013.
- [73] Drew A. Hall, Richard S. Gaster, Kofi A. A. Makinwa, Shan X. Wang, and Boris Murmann. A 256 pixel magneto-resistive biosensor microarray in 0.18 um cmos. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 48(5) :1290 – 1301, May 2013.
- [74] Kyunglok Kim et al. Magneto-resistive biosensors with on-chip pulsed excitation and magnetic correlated double sampling. *Scientific Reports*, 8 :16493, 2018.
- [75] Changwook Min et al. Integrated microhall magnetometer to measure the magnetic properties of nanoparticles. *Lab on a Chip*, 17 :4000 – 4007, Oct 2017.
- [76] Solène Cherré et al. Rapid and specific detection of cell-derived microvesicles using a magneto-resistive biochip. *Analyst*, 142 :979 – 986, 2017.
- [77] <http://www.magarray.com/>.
- [78] <http://www.zeptolife.com/>.
- [79] <http://www.magnomics.pt/>.
- [80] David Issadore et al. μ hall chip for sensitive detection of bacteria. *Adv. Healthcare Mater.*, 2 :1224 – 1228, Mar 2013.

- [81] Carla Duarte, Tiago Costa, Carla Carneiro, Rita Soares, Andrei Jitariu, Susana Cardoso, Moisés Piedade, Ricardo Bexiga, and Paulo Freitas. Semi-quantitative method for streptococci magnetic detection in raw milk. *Biosensors*, pages 6 – 19, Apr 2016.
- [82] Chiun-Peng Lee, Mei-FengLai, Hao-TingHuang, Chi-WenLin, and Zung-HangWei. Wheatstone bridge giant-magnetoresistance based cell counter. *Biosensors and Bioelectronics*, 57 :48 – 53, Jan 2014.
- [83] J. Loureiro, R. Ferreira, S. Cardoso, P. P. Freitas, J. Germano, C. Fermon, G. Arrias, M. Pannetier-Lecoeur, F. Rivadulla, and J. Rivas. Toward a magnetoresistive chip cytometer : Integrated detection of magnetic beads flowing at cm/s velocities in microfluidic channels. *Appl. Phys. Lett.*, 95 :034104, Jul 2009.
- [84] J. Loureiro, P. Z. Andrade, S. Cardoso, C. L. da Silva, J. M. Cabral, and P. P. Freitas. Magnetoresistive chip cytometer. *Lab on a Chip*, 11 :2255 – 2261, Apr 2011.
- [85] David R. Walt. Optical methods for single molecule detection and analysis. *Analytical Chemistry*, 83 :1258 – 1263, Feb 2013.
- [86] Guanxiong Li, Shan X. Wang, and Shouheng Sun. Model and experiment of detecting multiple magnetic nanoparticles as biomolecular labels by spin valve sensors. *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, 40 :3000 – 3002, Jul 2004.
- [87] Alexandre Chícharo et al. Enhanced magnetic microcytometer with 3d flow focusing for cell enumeration. *Lab on a Chip*, 18 :2593 – 2603, Jul 2018.
- [88] G. Kokkinis, B. Plochberger, S. Cardoso, F. Keplinger, and I. Giouroudi. A microfluidic, dual-purpose sensor for in vitro detection of enterobacteriaceae and biotinylated antibodies. *Lab on a Chip*, 16 :1261 – 1271, Feb 2016.
- [89] Mathias Reisbeck et al. Hybrid integration of scalable mechanical and magnetophoretic focusing for magnetic flow cytometry. *Biosensors & Bioelectronics*, 109 :98 – 108, Mar 2018.
- [90] M. Giraud, F.D. Delapierre, A. Wijkhuisen, P. Bonville, M. Thévenin, G. Cannies, M. Plaisance, E. Paul, E. Ezan, S. Simon, C. Fermon, C. Féraudet-Tarisse, and G. Jasmin-Lebras. Evaluation of in-flow magnetoresistive chip cell-counter as a diagnostic tool. *Biosensors*, 9(105), 2019.
- [91] M. N. Baibich, J. M. Broto, A. Fert, F. Nguyen Van Dau, F. Petroff, P. Eitenne, G. Creuset, A. Friederich, and J. Chazelas. Giant magnetoresistance of (001) fe/(001) cr magnetic superlattices. *Physical review letters*, 61 :2472, 1988.
- [92] G. Binasch, P. Grünberg, F. Saurenbach, and W Zinn. Enhanced magnetoresistance in layered magnetic structures with antiferromagnetic interlayer exchange. *Physical review B*, 39 :4828 – 4830, March 1989.
- [93] P. Grüberg, R. Schreiber, Y. Pang, M. Brodsky, and H Sowers. Layered magnetic structures : evidence for antiferromagnetic coupling of fe layers across cr interlayers. *Physical Review Letters*, 57 :2442, 1986.
- [94] Myriam Pannetier, Claude Fermon, Gerald Le Goff, Juha Simola, and Emma Kerr. Low noise magnetoresistive sensors for current measurement and compasses. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 316 :246 – 248, 2007.
- [95] S. Foner. Vibrating sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 27 :548, 1956.
- [96] S. Foner. Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 30 :548 – 557, Jul 1959.
- [97] S. Foner. The vibrating sample magnetometer : Experiences of a volunteer. *Journal of Applied Physics*, 79 :4740 – 4745, 1996.
- [98] R. Sierocki, B. Jneid, A. Rouaix, M. Plaisance, C. Féraudet-Tarisse, B. Maillère, H Nozach, and S. Simon. An antibody targeting type iii secretion system induces broad protection against salmonella and shigella infections. *Unpublished manuscript.*, 2019.

- [99] R. Pecora. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2 :123 – 131, 2000.
- [100] W. I. Goldberg. Dynamic light scattering. *Am. J. Phys.*, 67(12) :1152 – 1160, Dec 1999.
- [101] Noel A. Clark, Joseph H. Lunacek, and George B. Benedek. A study of brownian motion using light scattering. *American Journal of Physics*, 38(5) :575 –, May 1970.
- [102] H. R. Hulett, W. A. Bonner, Janet Barrett, and Leonard A. Herzenberg. Cell sorting : Automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166 :747 – 749, Nov 1969.
- [103] Andrea Cossarizza et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*, 47 :1584 – 1797, 2017.
- [104] Jean-Luc D’hautcourt. Quantitative flow cytometric analysis of membrane antigen expression. In *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [105] Maria Cristina Mascolo, Yongbing Pei, and Terry A. Ring. Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large ph window with different bases. *Materials*, 6 :5549 – 5567, Nov 2013.
- [106] Joana Ferreira. *Lab on Chip microsystem for flow cytometric analysis, separation and counting of cells and particles*. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior Técnico – Lisbonne, 2011.
- [107] David C. Duffy, J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller, and George M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70 :4974 – 4984, 1998.
- [108] George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442 :368 – 373, Jul 2006.
- [109] P. Abgrall and A-M Gué. Lab-on-chip technologies : making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem — a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17 :15 – 49, 2007.
- [110] R. Fraioli, J.M. Manero, J. Gil, and C. Mas-Moruno. Blocking methods to prevent non-specific adhesion of mesenchymal stem cells to titanium and evaluate the efficiency of surface functionalization : albumin vs poly(ethylene glycol) coating. *Biomecánica*, 22 :7 – 15, 2014.
- [111] Rhonda Jack et al. Microfluidic continuum sorting of sub-populations of tumor cells via surface antibody expression levels. *Lab on a Chip*, 17 :1349 – 1358, Mar 2017.
- [112] Nicole Pamme and Andreas Manz. On-chip free-flow magnetophoresis : Continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates. *Analytical Chemistry*, 76 :7250 – 7256, Dec 2004.
- [113] S. Dutz, M. E. Hayden, and U. O. Häfeli. Fractionation of magnetic microspheres in a microfluidic spiral : Interplay between magnetic and hydrodynamic forces. *Plos One*, Jan 2017.
- [114] Lotien Richard Huang, Edward C. Cox, Robert H. Austin, and James C. Sturm. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 304 :987 – 990, May 2004.
- [115] Albert P. Philipse, Michel P. B. van Bruggen, and Chellapah Pathmamanoharan. Magnetic silica dispersions : Preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir*, 10 :92 – 99, 1994.
- [116] G. R. Wiese and T. W. Healy. Effect of particle size on colloid stability. *Transactions of the Faraday Society*, pages 490 – 499, Jan 1970.
- [117] Mathias Reisbeck et al. Magnetic fingerprints of rolling cells for quantitative flow cytometry in whole blood. *Scientific report*, Sep 2016.

Titre : Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante

Mots clés : biocapteur, diagnostic, laboratoire sur puce, magnétorésistance géante, microfluidique

Résumé : Les tests « *in vitro* » permettent d'établir près de 70% des diagnostics et leur développement pour une utilisation au plus près du patient apparaît donc comme un enjeu majeur de santé publique. Dans ce contexte, les critères ASSURED (« Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users ») a été défini par l'organisation mondiale de la santé pour que les chercheurs développent des outils de diagnostic dits « Point of Care » utilisables par le plus grand nombre. Avec l'essor de la microfluidique, la gamme des dispositifs possibles s'est élargie et des biocapteurs intégrés ont été développés, transformant le signal biologique d'une reconnaissance d'un biomarqueur par une sonde biologique en un signal optique, électrochimique, mécanique ou encore magnétique. Comme les milieux biologiques sont en grande majorité amagnétiques, les capteurs magnétiques ne sont pas affectés par l'utilisation de matrices biologiques complexes comme peuvent l'être les mesures optiques ou électrochimiques. De plus ces capteurs sont faciles à produire et intégrables dans les puces microfluidiques. Cette thèse a pour objectifs de concevoir un outil de diagnostic *in vitro*

basé sur des capteurs à magnétorésistance géante et de tester ses performances. Cette étude a été réalisée en utilisant une lignée cellulaire de myélome murin. Les cellules sont marquées spécifiquement par des particules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps dirigés contre un de leurs antigènes et sont passées dans le canal microfluidique au-dessus des capteurs. Cette méthode de détection dynamique permet de compter les objets magnétiques un par un. La difficulté réside dans la distinction des signaux spécifiques provenant des cellules marquées des signaux faux positifs induits par les billes restant en solution. Deux types de dispositifs ont été conçus dans cette thèse pour lever ce verrou. Le premier possède une couche inerte de séparation de quelques micromètres entre les capteurs GMR et le canal qui permet de supprimer les signaux des billes isolées. Le second dispositif, qui a des capteurs à la fois au-dessus et au-dessous du canal microfluidique, permet une double détection simultanée de chaque objet magnétique. Il est ainsi possible de connaître le nombre de billes qui les marquent et de déterminer s'il s'agit d'un agrégat de billes ou d'un objet biologique.

Title : Development of a lab on a chip for the detection of eukaryotic cells by giant magnetoresistance sensors

Keywords : biosensor, diagnostic, giant magnetoresistance, lab on a chip, microfluidics

Abstract : The « *in vitro* » tests are requested for the establishment of nearly 70% of diagnoses and their development for on-site detection therefore appears to be a major public health issue. In this context, the ASSURED criterion (« Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users ») has been defined by the World Health Organization to encourage researchers to develop diagnostic tools called « Point of Care » that can be widely used. With the rise of microfluidics, the range of possible devices has broadened and integrated biosensors have been developed, transforming the biological signal from a biomarker recognition by a biological probe into an optical, electrochemical, mechanical or magnetic signal. As biological environments are largely non-magnetic, magnetic sensors are not affected by the use of complex biological matrices as are optical or electrochemical measurements. In addition, these sensors are easy to produce and can be integrated into microfluidic chips. The objectives of this thesis are to design

a diagnostic tool *in vitro* based on giant magnetoresistance sensors and to test its performance. Its development was carried out using a murine myeloma cell line. The cells are specifically labeled by magnetic particles functionalized by antibodies directed against one of their antigens and flown in the microfluidic channel above the sensors. This dynamic detection method allows magnetic objects to be counted one by one. The challenge is to distinguish the signals coming from the labeled cells from those of the beads remaining in solution. In order to address this problem, two labs on chips are developed in this thesis. In a first device, an inner layer of a few micrometers separates the sensors from the channel which allows to suppress the signals of the isolated beads. The second device has sensors both above and below the microfluidic channel and can measure the number of beads corresponding to each doubly detected object which can thus be identified (aggregates or biological objects).

