



HAL
open science

Biopuce à deux étages à base de capteurs à magnéto-résistance géante pour du diagnostic précoce d'objets biologiques microniques

Maïkane Deroo

► **To cite this version:**

Maïkane Deroo. Biopuce à deux étages à base de capteurs à magnéto-résistance géante pour du diagnostic précoce d'objets biologiques microniques. Physique [physics]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASP146 . tel-03990466

HAL Id: tel-03990466

<https://theses.hal.science/tel-03990466v1>

Submitted on 15 Feb 2023

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.

Biopuce à deux étages à base de capteurs à
magnétorésistance géante pour du diagnostic
précoce d'objets biologiques microniques

*Two-staged biochip based on giant magnetoresistance sensors for early diagnosis
of micronic biological objects*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 564 - Physique en Ile-de-France (PIF)

Spécialité de doctorat : Physique

Graduate School : Physique. Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée au Service de Physique de l'Etat Condensé (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS) et au Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (Université Paris-Saclay, INRAE, CEA), sous la direction de **Stéphanie SIMON**, directrice de recherche CEA, le co-encadrement de **Cécile FERAUDET-TARISSE**, ingénieure-chercheuse CEA et de **Guénaëlle JASMIN-LEBRAS**, ingénieure-chercheuse CEA

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 07 décembre 2022, par

Maïkane DEROO

Composition du Jury

Antoine PALLANDRE Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Lise-Marie LACROIX Maîtresse de conférence, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapportrice & Examinatrice
Vincent AGACHE Directeur de recherche, CEA	Rapporteur & Examineur
Renaud BACHELOT Professeur, Université de Technologie de Troyes	Examineur
Jean BAUDRY Directeur de recherche, ESPCI	Examineur
Stéphanie SIMON Directrice de recherche, CEA	Directrice de thèse

Remerciements

Dziękuję Ευχαριστώ Kiitos Tak
有り難う Obrigado 谢谢 Hvala 有り難う
Tack תודה Merci Danke Terima kasih
謝謝 Grazie Thank you Gracias ขอบคุณ Kiitos
ありがとう 감사합니다 شكرا 謝謝 Спациби
Mulțumesc Спациби Спацибо Dankon
Хвала Благодаря Asante Děkuju
شكراك ありがとう Teşekkür ederim

C'est avec émotion que je clôture ces trois années de thèse au sein de mes deux laboratoires, le LNO et le LERI. Ce fut pour moi, un réel plaisir de travailler avec vous tous. C'est pourquoi, je tiens à remercier dans un premier temps Patrice Roche de m'avoir accueillie dans son service qu'est le Service de Physique de l'Etat Condensé (SPEC) ainsi que Michel Viret au sein de son laboratoire, le Laboratoire de Nanomagnétisme et Oxydes (LNO). Mais également Stéphanie Simon, qui est aussi ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie au sein de son service, le Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) et de son laboratoire, le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI). Merci pour tous les points pertinents que tu as soulevés, qui m'ont permis d'avancer et de me perfectionner surtout au niveau biologie.

Je remercie les membres de mon jury, Antoine Pallandre, Vincent Agache, Lise-Marie Lacroix, Renaud Bachelot, Jean Baudry et Anne-Marie Haghiri-Gosnet (invitée), d'avoir bien voulu examiner et/ou rapporter mes travaux de thèse.

Un grand merci à mes deux encadrantes de thèse Guénaëlle Jasmin-Lebras, côté physique et Cécile Féraudet-Tarisse, côté biologie pour leur soutien sans relâche, leur bienveillance, leur gentillesse et leur pédagogie tout au long de ces trois années de thèse. Grâce à vous, j'ai pu allier la physique à la biologie ce qui m'a énormément plu et m'a donné envie de poursuivre dans cette voie. Merci également pour votre côté humain nécessaire pour cette épreuve qu'est le doctorat, nos repas, nos goûters où toute la grande famille du projet DIAMS a pu se réunir et qui je pense va perdurer encore de nombreuses années. C'est cette atmosphère de travail qui m'a donné confiance en moi, de l'enthousiasme, de la détermination et de la bonne humeur tout au long de ces trois ans.

Mes remerciements vont également à Aurélie Solognac pour sa grande expertise du projet, ses idées, les différentes formations scientifiques qu'elle a pu me donner mais aussi pour sa sympathie, sa patience et sa disponibilité. Claude Fermon et Myriam Pannetier-Lecoeur avec qui j'ai beaucoup collaboré concernant la fabrication des couches GMR et leurs grandes compétences en magnétisme, précieuses pour ce projet. Je tiens également à remercier Pierre Bonville qui, riche de son expérience en programmation Fortran, nous a beaucoup aidé à développer les programmes de simulations et de traitement des données en langage Python, mais également pour ses petits cours de magnétisme, sa patience et sa gentillesse à toute épreuve puis pour le jus de pomme et les pommes de son verger. Merci également à Mathieu Thévenin et Frédéric Coneggio pour leur gros coup de pouce en électronique. Pour la conception de pièces mécaniques et imprimés en 3D, je tiens à remercier Grégory Cannies et Gérald Le-Goff. Pour la fabrication des capteurs et la découpe, Elodie Fabre-Paul et Sébastien Delprat. Pour leur aide précieuse en culture cellulaire, Anne Wuijkhuizen, Marc Plaisance, Stéphanie Gelhaye et Patricia Brochard. Pour leurs réponses à mes questions en microfluidique, Karla Perez-Toralla, Florent Malloggi et Julie Lachaux. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'atelier, Vincent, Dominique, Pascal et Jean-Claude pour leur grande disponibilité, Corinne Kopec-Coelho et Nathalie Royer pour leurs tâches administratives ainsi que Nadine pour l'entretien des locaux. Et pour finir, l'ensemble du SPEC et du SPI.

Lors de ces trois années, il m'a été permis de réaliser plusieurs collaborations concernant la fabrication de billes nanomagnétiques à forte stabilité colloïdale. Tout d'abord avec le laboratoire de Physicochimie des Electrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux (PHENIX) dont je remercie Jean-Michel Siaugue et Emilie Secret puis avec le Laboratoire d'Innovation pour les Technologies des Energies nouvelles et des Nanomatériaux (LITEN) dont je remercie Olivier Poncelet. Pour les photos au MEBE, je tiens à remercier le group Zeiss de Cergy-Pontoise et en particulier Christophe Depagne.

Pour leur soutien et l'intérêt pour notre projet, merci à Anne-Sophie Lallemand et Olivier Limousin.

Une pensée toute particulière pour mon collègue de bureau Igor avec qui j'ai partagé ces trois ans de galère et qui a soutenu sa thèse un jour après moi, toutes mes félicitations Dr Ngouagnia ! Mais également

à Omar, Binh, Grégou, Anyssa, Paulo et Anas avec qui j'ai sympathisé lors de notre semaine aux Houches qui ressemblait plus à des vacances qu'à une semaine de séminaire mais qui tombait à pic juste après le Covid. Nos soirées aux Artistes ou ailleurs, notre week-end à Saint Malo, nos discussions autour d'un café à refaire le monde et aussi à se raconter nos vies m'ont vraiment permis de me sentir accompagnée tout au long de ces trois années ! Adel, Ramon, Emma pour nos pauses café mais aussi Chloé, Julien, Elmer, Sanjay, Mahé, Kévin, Léo, Eric, Wanissa, Denista, Samson, Zixin, Titiksha ... avec qui j'ai passé de très bons moments également. Mes deux supers stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler Mathieu Jeckelmann et Antonin Duret. Merci également à mes collègues du LERI qui m'ont très bien accueilli et avec qui j'ai eu un très bon feeling Dom, Anne So, Julie, Céline, Hervé, Fanny, Christian, Justine, Menel, Loïs, Nina, Elise, Boubou, Anaïs, Patricia, Gwenaëlle, Alexandra, Audrey ...

Une pensée pour Manon Giraud qui a lancé le projet au côté de Gwen et Cécile avec une première thèse puis qui m'a passé le flambeau en 2019. Je le passe à mon tour à Agathe Trillat pour une troisième thèse, j'espère que tu t'épanouiras autant que Manon et moi.

Il est temps de passer aux remerciements plus personnels. Tout d'abord à mes amis toujours présents et des fois depuis plus de 10 ans. Ils ont été d'un grand soutien tout au long de mes études et en particulier pour ces trois années de thèse. Aurélie et mes séjours réguliers dans ma deuxième famille cherbourgeoise entourée d'Emilie, Alex, David, Célou, Fabienne, Corentin et Louison. Delphine et nos escapades à Grenoble pour changer d'air le temps d'un week-end. Anastasia et Océane, nos appels hebdomadaires et nos week-ends autrichiens. Emilie et Clément qui ont pris le temps de m'écouter les soirs de petits coups de mou. François et Stan toujours présents pour des soirées mémorables et des week-ends à Mich Mich. Marine qui m'a beaucoup aidé ces derniers temps à avancer et à me motiver. Mathieu que je ne vois pas souvent mais qui est toujours d'excellente humeur et avec qui je passe de très bons moments à rigoler. Annaëlle pour ces très bons moments à se remémorer nos souvenirs d'enfance. Rudy pour sa bienveillance, son soutien et son écoute. Sanna, Aum, Srinivas et Kim Tuyen pour leur soutien venu de Taïwan. Merci également à Antonio et Ludovic pour leur aide ponctuelle dans ce projet.

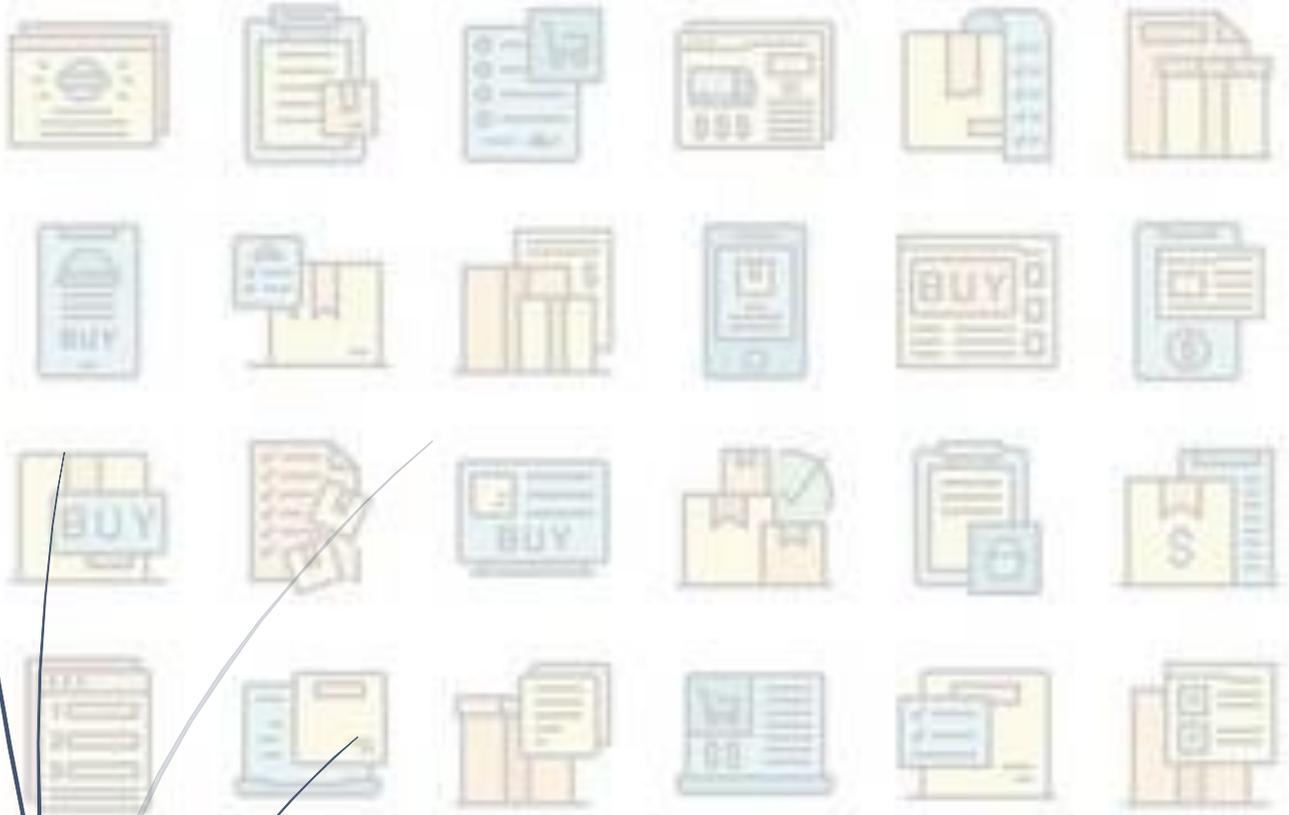
Et pour finir, je tiens sincèrement à remercier mes parents Philippe et Nathalie qui n'ont jamais cessé de croire en moi, de me soutenir et surtout de me permettre de franchir toutes ces étapes pour en arriver aujourd'hui au grade de Docteur en physique. Merci Papa d'avoir été une oreille attentive, réconfortante et surtout de toujours trouver des solutions à tous mes problèmes notamment lors des différents bugs informatiques que j'ai pu avoir et merci maman d'avoir travaillé aussi dur pour me payer toutes ces études, tu m'as dit un jour « pour toi, je travaillerais même la nuit » et dieu sait que ton métier est compliqué. J'espère un jour pouvoir vous le rendre au centuple car sans vous je n'aurais pas pu aller bien loin !

Une dernière pensée pour marraine Hélène qui aurait sûrement été fière de moi.

Merci infiniment et bonne lecture !



Sommaire



Maikane DEROO

Remerciements	3
Sommaire	7
Acronymes et abréviations	15
0 - Introduction	19
0.1. Table des figures & tableaux	21
0.2. Références.....	31
1 - Principes et rappels généraux.....	35
1.1. Table des figures & tableaux	37
1.2. Principe de l'immunodétection.....	39
1.2.1. Les anticorps.....	39
1.2.1.1. Description des anticorps.....	39
1.2.1.2. Production des anticorps	40
1.2.2. Utilisation des anticorps en immunodétection.....	42
1.2.2.1. Tests immunochromatographiques (tests bandelettes).....	42
1.2.2.2. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	43
1.2.2.3. Cytométrie en flux.....	44
1.3. Rappels de magnétisme	45
1.3.1. Diamagnétisme	46
1.3.2. Paramagnétisme	46
1.3.3. Ferromagnétisme	47
1.3.4. Antiferromagnétisme et ferrimagnétisme	48
1.3.5. Superparamagnétisme	49
1.4. Les capteurs à magnétorésistance géante.....	50
1.4.1. Electronique de spin.....	50
1.4.2. Effet GMR	51
1.4.3. Vanne de spin.....	52
1.4.4. Composition et géométrie des capteurs GMR.....	53
1.4.5. Magnétorésistance et sensibilité des capteurs GMR.....	54
1.4.6. Sources du bruit	56
1.4.6.1. Le bruit thermique	56
1.4.6.2. Le bruit en 1/f.....	56
1.4.6.3. Le bruit télégraphique (RTN).....	57
1.4.6.4. Autres bruits.....	57
1.4.6.5. Mesures de bruit et détectivité.....	57
1.5. Etat de l'art des précédentes biopuces.....	58

1.6. Références.....	60
2 - Biopuce GMR à deux étages	63
2.1. Table des figures & tableaux	65
2.2. Principe de la biopuce GMR à deux étages.....	67
2.3. Fabrication de la nouvelle biopuce	68
2.3.1. Fabrication des capteurs	68
2.3.2. Découpe des wafers	70
2.3.3. Recuit des capteurs	70
2.3.4. Conception du canal microfluidique	70
2.4. Montage expérimental.....	72
2.4.1. Montage de la biopuce sur le PCB	73
2.4.2. Détermination de la sensibilité des capteurs GMR hors du montage expérimental.....	74
2.4.3. Aimant permanent	75
2.4.4. Fluidique.....	75
2.4.5. Electronique	76
2.5. Traitement des données	78
2.5.1. Structure des données	78
2.5.2. Détermination du bruit de chaque capteur	78
2.5.3. Détection des pics	79
2.5.4. Validation par la forme des signaux.....	80
2.5.5. Recherche des coïncidences	81
2.5.6. Chi carré	81
2.5.7. Détermination de la hauteur de passage et du moment magnétique	82
2.6. Conclusion	86
2.7. Références.....	87
3 - Mise au point des conditions expérimentales	89
3.1. Table des figures & tableaux	91
3.2. Préparation des échantillons.....	93
3.2.1. Lignées cellulaires utilisées	93
3.2.1.1. Culture des cellules NS1	94
3.2.1.2. Culture des cellules CHO	94
3.2.2. Choix et préparation des billes magnétiques.....	94
3.2.2.1. Choix des billes magnétiques	95
3.2.2.2. Caractéristiques magnétiques des billes.....	95
3.2.2.3. Couplage des billes magnétiques	96

3.2.2.4. Fonctionnalisation des billes magnétiques Dynabeads et des billes Micromod 500 nm ...	97
3.2.2.4.1. Biotinylation des anticorps.....	97
3.2.2.4.2. Immobilisation des anticorps biotinylés en surface des billes.....	98
3.2.2.5. Fonctionnalisation des billes magnétiques Carboxyl-Adembeads 200 nm (Ademtech).....	98
3.3. Protocole expérimental.....	99
3.3.1. Immunocapture des cellules NS1.....	99
3.3.1.1. Avec les billes dynabeads MyOne.....	99
3.3.1.2. Avec les billes Micromod 500 nm.....	100
3.3.1.3. Avec les billes Adembeads 200 nm.....	101
3.3.2. Mise en place de l'expérience.....	102
3.4. Optimisation de la préparation des échantillons biologiques magnétiquement marqués.....	103
3.4.1. Immunocapture des objets biologiques.....	104
3.4.1.1. Vérification de la labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne par Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEBE).....	105
3.4.1.2. Labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne dans différents milieux biologiques et durée/température d'immunocapture.....	106
3.4.1.2.1. PBS, PBS+BSA+EDTA et milieu de culture.....	106
3.4.1.2.2. Sérum de veau fœtal et plasma de lapin.....	107
3.4.1.3. Choix des anticorps : labélisation et agrégation des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec différents anticorps anti-NS1.....	108
3.4.1.3.1. Anticorps anti-CD38.....	109
3.4.1.3.2. Anticorps anti-CD184.....	109
3.4.1.3.3. Anticorps anti-H-2K ^d /H-2D ^d	110
3.4.1.3.4. Mélange des quatre anticorps spécifiques aux cellules NS1.....	110
3.4.1.4. Détermination de la concentration optimale en billes Dynabeads MyOne pour l'immunocapture des cellules NS1.....	111
3.4.2. Réduction de l'état d'agrégation des billes magnétiques.....	112
3.4.2.1. Sonication des billes magnétiques Dynabeads MyOne et Adembeads.....	112
3.4.2.1.1. Sonication et cinétique de suivi des agrégats pour les billes magnétiques Dynabeads MyOne.....	114
3.4.2.1.2. Sonication et cinétique de suivi des agrégats pour les Adembeads carboxyles 200 nm.....	115
3.4.2.1.3. Conclusion.....	116
3.4.2.2. Fragmentation F(ab') ₂ à partir d'anticorps monoclonaux.....	117
3.4.2.2.1. Utilisation d'un anticorps témoin.....	118
3.4.2.2.2. Fragmentation F(ab') ₂ par digestion pepsique en milieu acide.....	119
3.4.2.2.3. Fragmentation F(ab') ₂ par ficinolyse en milieu neutre.....	122

3.4.2.3. Fabrication de nouvelles billes magnétiques à forte stabilité colloïdale	124
3.4.2.3.1. Caractéristiques magnétiques des billes du LITEN.....	124
3.4.2.3.2. Potentiel Zêta	125
3.4.2.3.3. Synthèse des billes Fe ₃ O ₄ - PVA.....	125
3.4.2.3.4. Billes magnétiques Fe ₃ O ₄ -PVA-SiO ₂	128
3.4.2.3.5. Billes magnétiques Fe ₃ O ₄ -PVA-SiO ₂ -SiCH ₂ -OH	128
3.4.2.3.6. Billes magnétiques Fe ₃ O ₄ -PVA-SiO ₂ -NH ₂ Al(OH) ₃ P-COOH	129
3.4.2.3.7. Billes magnétiques Fe ₃ O ₄ -PVA-SiO ₂ -Bore quinoline-P-COOH.....	130
3.4.2.3.8. Conclusion	132
3.5. Autres techniques de diagnostic	132
3.5.1. Test bandelettes.....	132
3.5.2. Tests ELISA sandwich.....	133
3.5.3. Cytométrie en flux.....	134
3.6. Références.....	134
4 - Résultats sur un modèle de cellules eucaryotes & Discussion	137
4.1. Table des figures & tableaux.....	139
4.2. Résultats.....	141
4.2.1. Détection GMR des cellules NS1 labélisées avec les billes magnétiques Dynabeads MyOne de 1 µm de diamètre.....	142
4.2.1.1. Données préliminaires	142
4.2.1.2. Evaluation de la spécificité du test.....	144
4.2.1.3. Evaluation de la sensibilité du test de détection	147
4.2.1.4. Objets biologiques non détectés.....	150
4.2.1.4.1. Explications biologiques	151
4.2.1.4.2. Explications magnétiques.....	152
4.2.2. Détection GMR des cellules NS1 labélisées avec les billes magnétiques Micromod 500 nm..	154
4.2.2.1. Données préliminaires	154
4.2.2.2. Evaluation de la spécificité du test.....	156
4.2.2.3. Evaluation de la sensibilité du test de détection	158
4.2.3. Conclusion	160
4.2.4. Comparaison avec les méthodes courantes de diagnostic	161
4.2.4.1. Test bandelette	161
4.2.4.2. ELISA	161
4.2.4.3. Cytométrie en flux.....	162
4.3. Discussion.....	162

4.4. Références.....	164
5 - Premiers essais sur un modèle de bactéries.....	165
5.1. Table des figures & tableaux.....	167
5.2. Bactéries et anticorps utilisés.....	169
5.2.1. Culture.....	169
5.2.1.1. Préparation des milieux de culture.....	169
5.2.1.2. Première remise en culture des bactéries.....	170
5.2.1.3. Repiquage des bactéries.....	170
5.2.1.4. Congélation des souches bactériologiques.....	171
5.2.1.4.1. Sous forme de glaçons de glycérol.....	171
5.2.1.4.2. Sous forme de cryobilles.....	171
5.2.2. Bactéries.....	172
5.2.2.1. Identification des bactéries d'intérêt.....	172
5.2.2.2. Correspondance entre la turbidité à 600 nm et la concentration en bactéries.....	174
5.2.3. Anticorps.....	175
5.2.3.1. Production des anticorps dirigés contre <i>X. arboricola</i> CFBP 7634.....	175
5.2.3.2. Purification de l'anticorps Xantho5.....	176
5.2.3.3. Caractérisation de l'anticorps.....	176
5.3. Protocole expérimental.....	178
5.3.1. Conception d'une biopuce pour les bactéries.....	178
5.3.2. Préparation des échantillons.....	179
5.3.3. Immunocapture des bactéries <i>X. arboricola</i> CFBP 7634.....	181
5.3.4. Mise en place de l'expérience.....	183
5.4. Résultats.....	183
5.5. Conclusion.....	189
5.6. Références.....	189
6 - Conclusion.....	191
6.1. Références.....	196
7 - Annexes.....	197
7.1. Annexe A - Fiche produit SU-8 2002 et 2007.....	199
7.2. Annexe B - Fiche produit SU-8 2025.....	204
7.3. Annexe C - Fiche produit NOA81.....	209
7.4. Annexe D - Fiche produit des billes Adembeads 200 nm.....	211
7.5. Annexe E - Fiche produit des billes Micromod 500 nm.....	213
7.6. Annexe F - Fiche produit des billes Dynabeads 1 micromètre.....	214

7.7. Annexe G - Fiche produit du kit Pierce.....	216
7.8. Annexe H - Fiche produit du bioanalyseur Agilent 2100.....	221
7.9. Annexe I - Composition du milieu LPGA pour les bactéries <i>X. arboricola</i>	228
7.10. Annexe J - Protocole de mise en culture des souches de <i>X. arboricola</i>	229
7.11. Annexe K - Article publié	230
8 - Résumé.....	243



Acronymes et abréviations



Maikane DEROO

Adembeads 200	Carboxyl-Adembeads 200 nm	MC	Milieu de Culture
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	MEB	Microscopie Electronique à Balayage
APTS	Acide ParaToluèneSulfonique	MEBE	Microscopie Electronique à Balayage Environnemental
ASSURED	Affordable - Sensitive- Specific- User Friendly- Rapid- Equipment Free and Delivered	MEG	Magnétoencéphalographie
BIN	Fichier binaire	MR	MagnétoRésistance ou MagnétoRésistif
BNC	Bayonet Nut Coupling	MRAM	Magnetic Random Access Memory (mémoire vive magnétique)
Bp	Base Pair (Paire de Base)	NEM	N-éthylmaléimide
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)	NOA	Norland Optical Adhesive
CAS	Chèvre Anti-Souris	PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampon phosphate Salin)
CFBP	Collection Française de Bactéries associées aux Plantes	PCB	Printed circuit board (circuit imprimé)
CFU	Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie)	PCR	Polymerase Chain Reaction
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate	PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
Chi carré	χ^2	PEG	PolyEthylène Glycol
CHO	Chinese Hamster Ovary cells, lignée cellulaire choisie pour les tests non pertinents	PL	Plasma de Lapin
CIRM	Centre International de Ressources Microbiennes	POC	Point of care devices (Outils de diagnostic au chevet du patient)
DMF	N,N-diméthylformamide	polyHRP	PolyHorseRadishPeroxydase (enzyme peroxydase de raifort)
DNTP	DesoxyriboNucléotide TriPhosphate	PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
DO	Densité Optique	PVA	PolyAcétate de Vinyle
Dyna 1	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
Dyna 2,8	Dynabeads M-280 tosylactivated	PVP	PolyVinylPyrrolidone
Eau DI	Eau Dé-Ionisée	RPM	Round Per Minute (Rotation Par Minute)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (milieu utilisé en culture cellulaire NS1)

EDTA	Éthylènediaminetétraacétique	RTN	Random Telegraph Noise (bruit télégraphique)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	SNR	Signal Noise Ratio (rapport signal sur bruit)
Enzyme G4	Enzyme acétylcholinestérase	SPR	Surface Plasmon Resonance (Résonance Plasmonique de Surface)
FCC	Flat Cable Connector (câble flexible de connection)	SQUID	Superconducting QUantum Interference Device
FSC	Forward SCatter	SSC	Side SCatter
GMR	Giant MagnetoResistance (magnétorésistance géante)	SVF	Sérum de Veau Fœtal
Ig	ImmunoGlobine	TCID₅₀	50% Tissue Culture Infectious Dose (infection de 50% des cellules en culture par ml)
LERI	Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse	TEOS	TétraEthyle OrthoSilicate
LFA	Lateral Flow Immunoassays (tests bandelettes)	THF	TétraHydroFurane
LITEN	Laboratoire d'Innovation pour les Technologies des Energies nouvelles et des Nanomatériaux	TMB	3,3',5,5'-TétraMéthylBenzidine
LNO	Laboratoire de Nano-magnetisme et Oxydes	TMR	Tunneling Magneto Resistance (magnétorésistance à effet tunnel)
LOC	Lab-on-a-chip (laboratoire sur puce)	US	Ultrason
LOD	Limit of Detection (limite de détection)	UV	Ultra-Violet
LoQ	Limit of Quantification (limite de quantification)	VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
LPGA	Levure Peptone Glucose Agar	VSM	Vibrating Sample Magnetometer
LPS	LipoPolySaccharide		

0 - Introduction



Maikane DEROO

0.1. Table des figures & tableaux

<i>Fig. 0.1 - Marché mondial des tests de diagnostic au chevet du patient (POC) [1]</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 0.2 - Configuration d'un biocapteur montrant les éléments de biorecognition, d'interface et de transduction</i>	<i>24</i>
<i>Fig. 0.3 - Sensibilité des capteurs magnétiques les plus utilisés et quelques correspondances avec la vie quotidienne</i>	<i>25</i>
<i>Fig. 0.4 - Exemple de schéma de la détection statique d'une cible biologique par des capteurs magnétorésistifs au moyen de sondes d'anticorps</i>	<i>27</i>
<i>Fig. 0.5 - Objectifs de la thèse qui consistent à développer un dispositif POC capable de détecter différents types d'objets biologiques en faible quantité dans des matrices complexes</i>	<i>29</i>

Certains cancers ou maladies infectieuses sont encore très mal diagnostiqués entraînant un diagnostic trop tardif, l'inefficacité des traitements et dans certains cas des conséquences majeures comme la mort du patient.

Le diagnostic précoce favorise donc les chances de guérison des patients. Comme les symptômes ont tendance à différer d'une personne à l'autre et peuvent correspondre à plusieurs maladies, l'anamnèse et l'examen physique du patient ne suffisent pas forcément au médecin pour établir avec certitude un diagnostic et des examens complémentaires sont souvent nécessaires pour être les garants du bon diagnostic. Les scientifiques tentent donc d'identifier des biomarqueurs¹ spécifiques et propres à chaque pathologie (cellules, virus, ADN, protéines, bactéries etc.) assurant un diagnostic et un suivi médical fiable. Certaines bases de données ont déjà été créées pour répertorier les biomarqueurs spécifiques à chaque maladie et les recherches se poursuivent pour les compléter (long et fastidieux). Parallèlement à l'enrichissement des bibliothèques scientifiques, il semble pertinent de travailler sur le développement d'outils capables de détecter ces biomarqueurs avec une bonne fiabilité, surtout dans les premiers stades du développement de la maladie, quand leur concentration est encore (très) faible. La grande majorité des maladies (cancers, infections, etc.) sont traitées beaucoup plus efficacement si elles sont diagnostiquées rapidement et précocement. D'autre part, elles ont des répercussions importantes sur le système de santé mais aussi sur l'économie et la stabilité sociale. Elles ont donc mis en évidence l'importance de développer de nouveaux tests de diagnostic au chevet du patient (Point of Care ou POC) pour améliorer la reconnaissance et l'intervention rapide face à celles-ci.

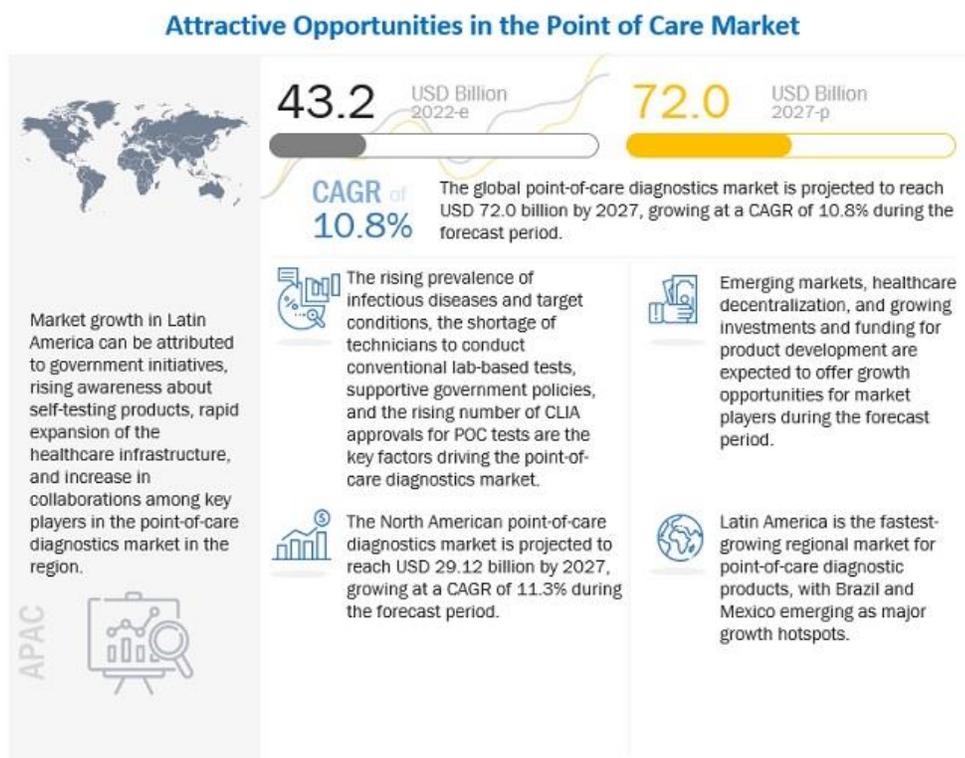


Fig. 0.1 - Marché mondial des tests de diagnostic au chevet du patient (POC) [1]

¹ Un biomarqueur est une caractéristique mesurable avec précision, utilisée comme indicateur d'une fonction du corps, d'une maladie ou de l'action d'un médicament [Fondation contre le cancer]

La pandémie actuelle (COVID-19) a également accéléré la demande mondiale de tests de diagnostic rapides et accessibles à tous. En effet, l'augmentation rapide du nombre de cas de COVID-19, la pression croissante sur les gouvernements pour améliorer la prise en charge des patients ainsi que la pénurie des tests PCR de confirmation et de personnel en laboratoire n'ont fait que souligner l'importance du développement des dispositifs POC. Le marché mondial de ces diagnostics devrait atteindre 72 milliards de dollars US d'ici 2027, contre 43,2 milliards de dollars US en 2022 avec un taux de croissance annuel moyen de 10,8 % entre 2022 et 2027 [1] (Fig. 0.1).

Néanmoins, de nombreux défis entravent encore l'évolution des outils POC transportables et cliniquement pertinents, dont le respect de normes réglementaires strictes tout en garantissant des prix de vente compétitifs. En raison de difficultés telles que les procédures d'échantillonnage, les faibles niveaux de sensibilité et de spécificité des échantillons et les exigences de lecture du signal, seuls quelques dispositifs POC pour le cancer, comme les plateformes à flux latéral, sont passés des laboratoires de recherche aux soins cliniques au chevet du patient [2].

Par rapport à des techniques utilisées en laboratoire et qui requièrent l'expertise d'un professionnel et du personnel qualifié, les tests de diagnostic au chevet du patient ont l'avantage de pouvoir être utilisés dans des régions dépourvues de toute infrastructure, d'être faciles d'utilisation et d'interprétation, rapides, sensibles et spécifiques, peu coûteux mais aussi utilisables à grande échelle afin d'éviter une pandémie. C'est ce que les critères ASSURED de l'Organisation Mondiale de la Santé définissent par le fait que les POC doivent être peu onéreux, sensibles, spécifiques faciles à utiliser, rapides et robustes, sans équipement et transportables (A=Affordable, S=Sensitive, S=Specific, U=User-friendly, R=Rapid, E=Equipment-free, D=Deliverable). Ces tests doivent être également non invasifs surtout s'ils sont répétés à plusieurs reprises lors du suivi d'une maladie, s'ils sont pratiqués sur des patients immunodéficients ou dans le cas des tests de dépistage massif. C'est pourquoi, ce genre de test nécessite aussi un volume d'échantillon, si possible très faible.

Le développement de nouvelles technologies de détection rapides et très sensibles est, entre autres, à la base de la conception de nouveaux dispositifs POC innovants. Ce développement et ces recherches sont déterminantes pour gagner en spécificité et en sensibilité de détection, et donc en précocité de diagnostic.

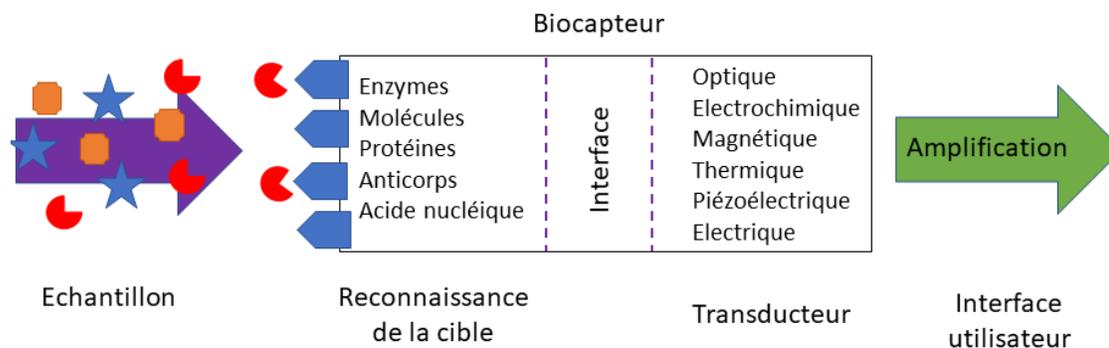


Fig. 0.2 - Configuration d'un biocapteur montrant les éléments de biorecognition, d'interface et de transduction

Modifié de [3].

Les progrès réalisés en matière d'ingénierie et de dispositifs intégrés microfabriqués pour le traitement à domicile représentent l'aboutissement de plus de 30 ans de recherche. Jusqu'à présent, diverses méthodes de détection novatrices ont été utilisées, comme les biocapteurs qui sont apparus depuis quelques années afin d'améliorer notre qualité de vie ainsi que notre système de santé. Ces derniers sont des dispositifs

constitués, d'une part, d'un élément sensible biologiquement actif (anticorps, ADN, etc.) capable de reconnaître une substance cible (antigènes, ADN complémentaire, etc.) et d'autre part d'un transducteur (optique, électrochimique, magnétique, etc.) qui transcrit les modifications induites par la reconnaissance entre le biorécepteur et la substance cible en des signaux physiques détectables et mesurables (qui peuvent être directement reliés à la concentration de cibles dans la matrice analysée) (Fig. 0.2).

Les biocapteurs peuvent être divisés en plusieurs catégories selon leur méthode de détection [3]. Les principaux sont les biocapteurs optiques et électrochimiques. Les méthodes optiques [4] sont basées sur la fluorescence, la polarisation ou la résonance plasmonique, elles présentent de bonnes performances et sont en réel progrès en termes de miniaturisation [5]. La cytométrie en flux est un exemple de dispositif basé sur une mesure optique qui est largement utilisé mais d'autres biocapteurs optiques sont actuellement commercialisés, tels que les instruments de séquençage ADN ou les dispositifs de résonance plasmonique de surface (SPR) utilisés pour caractériser les interactions entre protéines. Cependant, pour les outils de diagnostic au chevet du patient, les biocapteurs optiques ne sont pas adaptés aux matrices complexes opaques comme le sang. L'autofluorescence et l'absorption de la lumière limitent aussi l'utilisation de cette technique. Les biocapteurs électrochimiques [6], quant à eux, reposent sur des mesures potentiométriques, ampérométriques et impédimétriques. Les plus courants sont les glucomètres qui mesurent la concentration de glucose par réaction enzymatique et les convertissent en mesures ampérométriques. Mais d'autres dispositifs sont commercialisés, comme les cytomètres à impédance. Les avantages de ce type de capteurs sont leur capacité de miniaturisation et leur faible coût.

Néanmoins, d'autres méthodes de détection comme les capteurs magnétiques ont connu un véritable essor depuis un peu plus d'une décennie pour des applications dans le domaine de la médecine du futur, et en particulier pour certains d'entre eux, dans le développement de systèmes POC. La Fig. 0.3 montre différents types de capteurs magnétiques et les diverses applications possibles en fonction de leur gamme de détection de champ magnétique [7]. Cinq technologies principales existent pour détecter des champs. Deux d'entre elles, l'effet Hall et les capteurs GMR/TMR détectent directement le champ magnétique alors que les bobines, les fluxgates (magnétomètres à saturation) et les SQUIDS détectent des variations de flux magnétique.

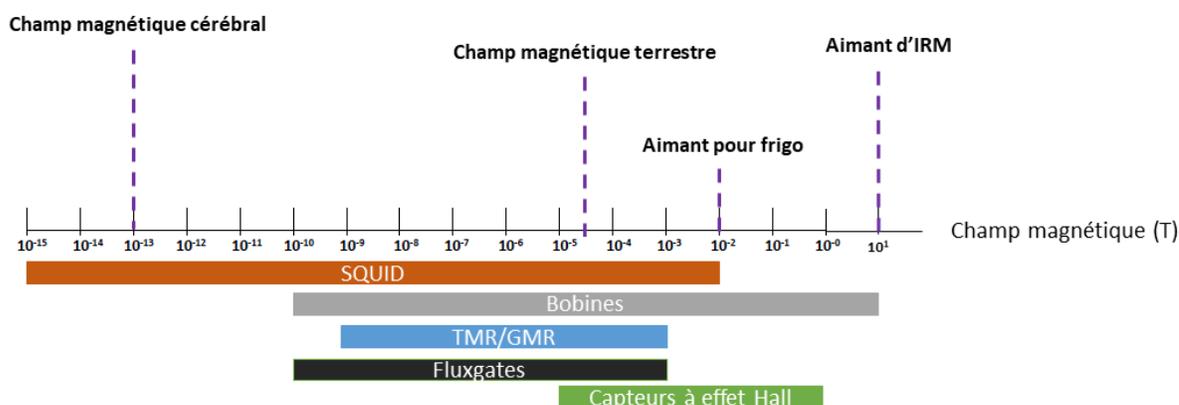


Fig. 0.3 - Sensibilité des capteurs magnétiques les plus utilisés et quelques correspondances avec la vie quotidienne Modifié de [19].

Les objets biologiques n'étant pas intrinsèquement magnétiques, leur détection repose sur l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées par des anticorps qui se lient spécifiquement aux cibles biologiques d'intérêt. Les moments magnétiques de ces billes sont ensuite polarisés par un aimant permanent et détectés

par le capteur magnétique. Ces capteurs présentent une spécificité et une sensibilité élevées, ainsi qu'un rapport signal/bruit élevé, en raison du signal de fond magnétique négligeable des échantillons biologiques.

Comme indiqué sur la **Fig. 0.3**, les capteurs les plus sensibles sont les dispositifs d'interférence quantique supraconducteurs (SQUID), basés sur l'effet Josephson, qui apparaît lorsque deux matériaux supraconducteurs sont séparés par une très fine couche isolante [8]. Ces capteurs sont sensibles à des champs aussi bas que 10^{-15} Tesla et sont utilisés de manière assez courante pour la détection d'objets biologiques. Ils ont permis le développement d'immunoessais avec une détection d'anticorps IgE jusqu'à 2 attomole [9]. Un susceptomètre commercialisé à base de SQUID permettant de mesurer *in vitro* la quantité de fer dans le foie est par exemple une alternative aux biopsies [10]. Les SQUIDS sont également utilisés pour de la magnétoencéphalographie (MEG) [11]. Malgré leur sensibilité inégalée, ils doivent, pour fonctionner, être refroidis à l'hélium liquide et ne sont donc pas du tout adaptés pour des dispositifs POC peu coûteux et transportables.

Comme les SQUIDS, les bobines inductives ne mesurent pas un champ magnétique mais les variations de flux magnétiques à travers leur surface. En effet, leur sensibilité croît avec la surface les rendant inadaptés à des systèmes miniaturisés.

Parmi les capteurs magnétiques qui détectent directement les champs magnétiques, les plus anciens sont basés sur l'effet Hall où, sous l'influence d'un champ magnétique, les porteurs de charge sont déviés. Cette séparation de charges entraîne une différence de potentiel proportionnelle au champ magnétique qui peut donc être mesurée. Ils ont été utilisés pour détecter des interactions biomoléculaires [12]. Leur sensibilité est cependant moins bonne que celles des capteurs magnétorésistifs.

Les capteurs magnétorésistifs (MR), tels que les capteurs à magnétorésistance géante (GMR) et à magnétorésistance à effet tunnel (TMR), sont des capteurs très sensibles (défectivité² de l'ordre de 50 à 200 pT/ $\sqrt{\text{Hz}}$) et sont moins affectés par l'environnement de l'échantillon biologique, comme le pH et la température. Ils présentent en outre l'avantage d'être peu coûteux et de pouvoir être intégrés facilement dans des laboratoires sur puce. Les capteurs GMR sont les biocapteurs MR les plus étudiés et utilisés. L'effet GMR³ a été découvert à la fin des années 80 et se produit généralement dans une structure où des films minces ferromagnétiques et non magnétiques sont déposés alternativement. La magnétorésistance désigne la propriété d'un matériau qui tend à modifier sa résistance électrique lorsqu'un champ magnétique externe est appliqué. Cet effet permet de détecter des champs magnétiques très faibles (**Fig. 0.3**), rendant très attractif les capteurs GMR pour la détection POC hautement sensible de maladies infectieuses et/ou cancer. Deux structures différentes de capteurs GMR peuvent être utilisées : une structure multicouche ou une structure à vanne de spin. Il a été observé que la sensibilité des structures GMR multicouches augmente avec l'épaisseur de la couche ferromagnétique. Cependant, à partir d'une certaine épaisseur, l'effet GMR diminue [13]. Contrairement aux structures multicouches, le système en vanne de spin n'est composé que de deux couches ferromagnétiques séparées par une couche conductrice mais non magnétique. L'aimantation d'une des deux couches ferromagnétiques est fixe, tandis que l'aimantation de l'autre couche s'oriente librement. Bien que les capteurs à vanne de spin présentent une meilleure linéarité et peuvent fonctionner à des champs magnétiques plus faibles que les capteurs multicouches (intéressant pour des détections d'objets biologiques), ils possèdent généralement des rapports MR plus faibles car ils n'ont que deux couches ferromagnétiques contribuant à l'effet GMR. Ce type de capteurs est largement utilisé dans diverses applications telles que les disques durs [14], les mémoires vives magnétiques (MRAM) [15], la mesure de pression [16] [17], la détection de courant [18], la biodétection [19] [20] [21] mais aussi comme

² La défectivité correspond au champ magnétique pour lequel le rapport signal sur bruit vaut 1. Elle s'exprime en T/ $\sqrt{\text{Hz}}$. Elle permet la meilleure comparaison de performances des différents capteurs magnétiques

³ Prix Nobel en 2007

capteurs de mouvement et de déplacement dans les industries de l'automobile [22], etc. Le développement de ces capteurs pour les applications biomédicales est apparu à la fin des années 1990 lorsque Baselt et al. [23] ont démontré l'utilisation de réseaux de capteurs pour le dénombrement non visuel de billes magnétiques conjuguées à des molécules qui sont spécifiquement liées à la surface des capteurs. La détection des champs magnétiques (à l'aide de capteurs MR) émis par les billes magnétiques immobilisées est classée comme « détection statique » (explications détaillées ci-dessous).

Les capteurs TMR, quant à eux, sont plus sensibles d'un ordre de grandeur que les capteurs GMR mais ils présentent un bruit élevé à basse fréquence qui, tant qu'il n'est pas résolu, est un handicap pour la détection d'objets biologiques. Ils sont de surcroît plus compliqués à fabriquer. Ils sont actuellement en cours de développement et d'optimisation au sein du LNO⁴.

Dans ce travail de thèse, les capteurs GMR ont donc été choisis pour la détection des cibles biologiques d'intérêt (cellules cancéreuses et bactéries).

La détection des objets biologiques avec ces capteurs peut être statique, dynamique ou sous un format papier (type tests bandelettes). Avant de détailler la détection dynamique qui a été utilisée dans le cadre de ce travail de thèse, les deux autres méthodes sont décrites brièvement ci-dessous.

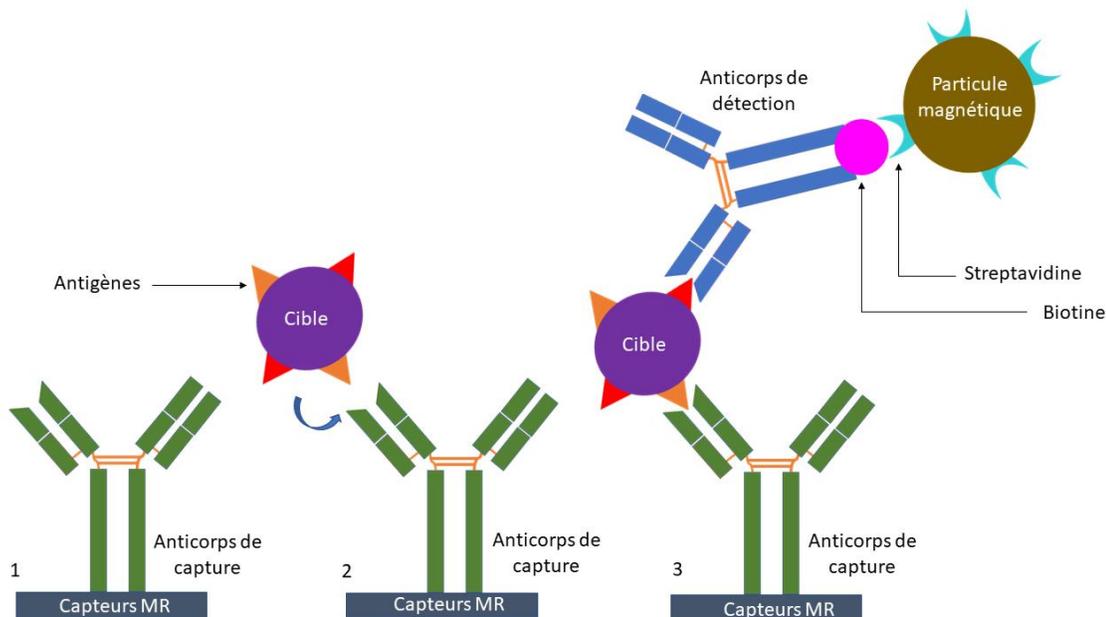


Fig. 0.4 - Exemple de schéma de la détection statique d'une cible biologique par des capteurs magnétorésistifs au moyen de sondes d'anticorps

1 - La surface du capteur MR est recouverte d'anticorps de capture. 2 - La cible est introduite dans le système et l'antigène de la cible se lie spécifiquement à l'anticorps de capture. 3 - Des particules magnétiques fonctionnalisées par de la streptavidine et couplées à des anticorps de détection (biotinylés) par le biais du complexe biotine-streptavidine sont introduites dans le système et se lient spécifiquement à la cible d'intérêt (via un autre antigène).

Les capteurs GMR peuvent servir pour des mesures magnétiques statiques suivant le même principe « sandwich » que les tests optiques ou électrochimiques. Ce terme « statique » est utilisé car les particules magnétiques utilisées pour la détection sont immobiles par rapport au capteur MR. Il s'agit de dispositifs

⁴ LNO : Laboratoire de Nano-magnétisme et Oxydes

dans lesquels un réseau de sondes (ADNc, aptamères, anticorps, etc.) est immobilisé sur le capteur pour capturer spécifiquement une cible (ADN, protéine, cellule, bactérie, etc.), présente dans une matrice complexe (sérum, sang, lait, etc.). Puis, la cible est détectée au moyen d'une deuxième sonde marquée avec une nanoparticule magnétique (MNP) [24] [25] (Fig. 0.4). Les mesures sont alors faites en appliquant des champs magnétiques statiques ou alternatifs, associées à des étapes de lavage pour supprimer les particules magnétiques non accrochées. Cette méthode présente l'avantage d'un multiplexage facile : il suffit de diviser la surface du capteur en différentes zones, chacune comportant une sonde immobilisée spécifique d'une cible différente. Par contre, elle favorise l'accroche non spécifique et donc les faux positifs.

Il existe également des dispositifs de dosage biologique à flux latéral (tests bandelettes) où les sondes (anticorps) sont immobilisées sur une structure poreuse à base de papier, dans laquelle la cible à détecter (qui ne doit pas être de taille conséquente (comme les cellules) sous peine de ne pas pouvoir migrer dans les pores) migre à travers la bandelette poreuse en interagissant avec les sondes magnétiquement marquées. La détection est alors effectuée par des capteurs GMR placés sous la bande de papier poreux (flux latéral statique) ou par un capteur MR qui scanne la totalité de la bande papier [26].

Une détection est dite « dynamique » lorsque les objets magnétiques circulent dans un canal microfluidique placé au-dessus (et/ou en dessous) des capteurs MR qui les détectent un à un [27] (notion de mouvement des particules magnétiques par rapport aux capteurs magnétiques). L'une des premières études de détection dynamique concerne l'utilisation de capteurs MR afin de déterminer la vitesse d'écoulement de particules magnétiques dans un canal microfluidique [28].

Comme indiqué précédemment afin de confiner les objets biologiques, les capteurs MR sont couplés à des dispositifs de nature microfluidique [29] [30] [31] qui permettent d'assurer l'entrée et la sortie d'échantillons et la détection dans une plateforme unique, ce qui facilite la miniaturisation, la transportabilité et l'intégration de plusieurs fonctions en un seul dispositif. Ce dispositif forme alors un laboratoire sur puce (LOC). Comparé aux autres méthodes de détections, les LOC présentent plusieurs avantages comme la facilité et la rapidité d'exécution des tests (des non-spécialistes peuvent l'utiliser sans formation particulière), la possibilité de multiplexer et la consommation d'un faible volume d'échantillon. L'utilisation de canaux de l'ordre du micromètre ne modifie en rien la vitesse d'analyse et ce dispositif peut être à usage unique ce qui élimine le risque de contamination. Grâce à ce type de POC, il est possible de détecter différents types d'objets biologiques comme les cellules cancéreuses, les bactéries ou les virus. Enfin, ces techniques microfluidiques présentent un grand intérêt en raison de leur capacité unique à travailler avec des flux laminaires, ce qui garantit une bonne reproductibilité des résultats. Elles permettent également de modifier rapidement les structures microfluidiques et d'effectuer plusieurs tests en même temps. Par conséquent, cette technique s'est révélée attractive dans divers domaines depuis son développement dans les années 90 et le concept de laboratoire sur puce ouvre de nouvelles possibilités pour les systèmes de détection.

De nouveaux dispositifs POC, constitués d'un système microfluidique et de capteurs GMR, ont vu le jour dans différents laboratoires pour la détection et la séparation de cellules cancéreuses. La détection d'objets biologiques entourés de nanoparticules magnétiques circulant dans une puce microfluidique à base de capteurs GMR a été réalisée et a donné des résultats encourageants sans pour autant être capable de vraiment différencier les objets biologiques des faux positifs provoqués par des agrégats de billes [19] [20] [32] [33].

De plus, les technologies POC sont également un outil utile dans le domaine de l'environnement car les polluants de l'air et de l'eau peuvent affecter la santé des êtres vivants (humains, animaux et plantes) [34]. La pollution de l'eau, de nature bactériologique et/ou chimique, est potentiellement présente partout, dans l'eau potable, les océans, les lacs et les aliments. Ces dernières années, elle est devenue une préoccupation

mondiale et, pour y répondre, la recherche sur des systèmes de détection rapide et de surveillance des polluants a augmenté fortement.

En résumé, les dispositifs POC doivent être capables de se rapprocher des tests de laboratoire en termes de performances (sensibilité et spécificité) mais avec un temps d'analyse et un rendu de résultat plus rapide sur le terrain, par tout type de personne et avec un coût inférieur dans le processus de fabrication. Les méthodes de laboratoire actuelles sont certainement appelées à être remplacées à l'avenir par ces technologies qui sont plus proches du patient et qui permettent de fournir rapidement aux médecins toutes les informations nécessaires pour établir un diagnostic fiable et prendre des décisions éclairées et rapides en matière de traitement.

L'objectif de cette thèse (**Fig. 0.5**) est donc d'obtenir un dispositif POC capable de détecter rapidement, de façon simple, sensible et spécifique, différents objets biologiques rares en réponse à un besoin d'urgence de diagnostic clinique, environnemental et/ou de biosécurité. Ce projet repose sur un test immunologique avec interaction anticorps/antigène et détection dynamique au moyen de capteurs GMR.

Des nanoparticules magnétiques (commerciales ou synthétisées pour ce projet) sont fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux, commerciaux ou produits au laboratoire JOLIOT/LERI⁵, dirigés contre les objets biologiques cibles. La détection dynamique de ces derniers, après interaction avec les nanoparticules magnétiques, est réalisée grâce aux capteurs GMR développés au SPEC/LNO qui permettent de compter les objets biologiques magnétiquement marqués un à un.

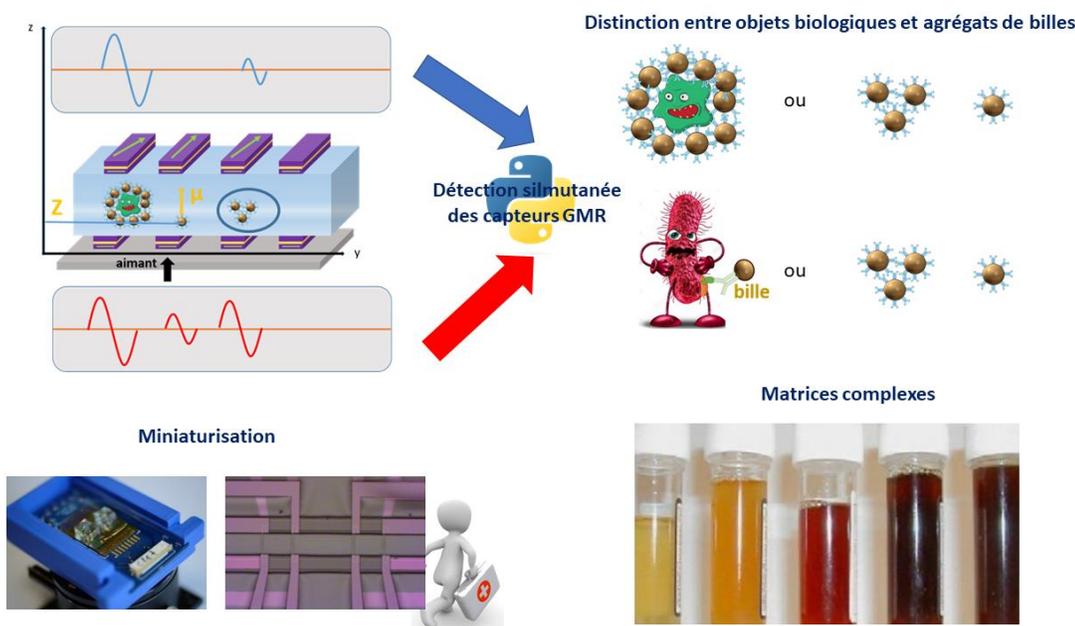


Fig. 0.5 - Objectifs de la thèse qui consistent à développer un dispositif POC capable de détecter différents types d'objets biologiques en faible quantité dans des matrices complexes

Idéalement, ce test ne doit nécessiter d'aucune préparation particulière des échantillons, il doit pouvoir s'adapter à tous les types de fluides (sang, plasma, urine, etc.), à tous les types de maladies et donc à tous les types de marqueurs. De plus, le diagnostic précoce étant crucial, il doit être capable de détecter ces

⁵ LERI : Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse CEA-SACLAY

biomarqueurs en très faible quantité dans les fluides physiologiques, alors que la maladie est encore à un stade très précoce de son développement.

Pour la première fois en 2019, au cours d'une thèse [19] il a été possible d'évaluer avec un prototype très simple de biopuce GMR (constituée d'une seule série de capteurs GMR sous le canal microfluidique), sur un modèle de cellules myélomateuses murines, la sensibilité, la spécificité et la robustesse de la détection, ainsi que la rapidité et la facilité d'utilisation de ce test de diagnostic. Avec une limite de détection de 3×10^4 cellules/mL, la sensibilité de ce premier prototype était bien meilleure que celle du test immunochromatographique et se rapprochait de celles obtenues, sur le même modèle biologique, avec un test ELISA ou par cytométrie en flux, avec l'avantage d'une plus grande facilité d'utilisation [20]. Le principal verrou technique avec cette première biopuce était lié à la présence d'agrégats de billes magnétiques (d'origine commerciale) à l'origine de faux positifs qui limitaient la sensibilité de détection. Une nouvelle architecture de biopuce a alors été brevetée (n° 1855217 étendu par voie internationale) et développée. Elle possède des capteurs GMR disposés face à face, de part et d'autre du canal microfluidique, pour détecter de manière simultanée chaque objet magnétique. Nous montrerons que pour la première fois, grâce à cette technique innovante de double détection GMR, il est possible de déterminer le moment magnétique des objets détectés et de différencier ainsi les signaux spécifiques issus des cellules labélisées par rapport aux faux positifs provenant d'agrégats de billes (Fig. 0.5). Pour pouvoir évaluer les performances (sensibilité, spécificité, robustesse de la détection, rapidité et la facilité d'utilisation) de ce nouveau dispositif et les comparer à celles du premier prototype, le même modèle de cellules myélomateuses murines a été utilisé. Des matrices complexes ont également été utilisées. Les résultats obtenus étant très encourageants, une étude similaire d'évaluation a débuté sur des bactéries, objets biologiques de plus petites tailles.

Le **chapitre 1** présente des rappels généraux d'immunologie et de magnétisme, une partie sur l'effet GMR, la composition et la géométrie des capteurs ainsi qu'une partie sur l'état de l'art des biopuces GMR précédentes pour finir sur les perspectives d'évolution d'un nouveau prototype.

Le **chapitre 2** est entièrement consacré à l'étude de la biopuce GMR à deux étages, de sa fabrication au traitement des données recueillies après chaque expérience. Une preuve de concept de cette nouvelle biopuce a été publiée et le programme de traitement des données a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Le **chapitre 3** présente, quant à lui, la mise au point des conditions expérimentales avec la préparation et l'optimisation des échantillons, le choix des billes magnétiques, le protocole expérimental, les essais réalisés et les perspectives envisageables pour la réduction de l'état d'agrégation des billes magnétiques et notamment par la synthèse sur mesure de toutes nouvelles billes magnétiques. Il présente aussi le détail des protocoles des tests comparatifs réalisés au moyen d'autres techniques courantes d'immunodétection (cytométrie en flux, ELISA, bandelette).

Le **chapitre 4** expose les résultats expérimentaux obtenus sur un modèle de cellules cancéreuses avec la biopuce GMR à deux étages et avec deux types de billes : les Dynabeads MyOne et les Micromod 500 nm. Il présente aussi la comparaison des performances de détection de la biopuce GMR à deux étages avec les autres techniques d'immunodétection (bandelette, ELISA, cytométrie en flux) mais également avec le premier prototype de biopuce GMR réalisé lors d'une précédente thèse.

Le **chapitre 5** établit la preuve de concept de la versatilité d'utilisation de la biopuce, avec quelques expériences préliminaires réalisées sur un modèle de bactéries non pathogènes.

0.2. Références

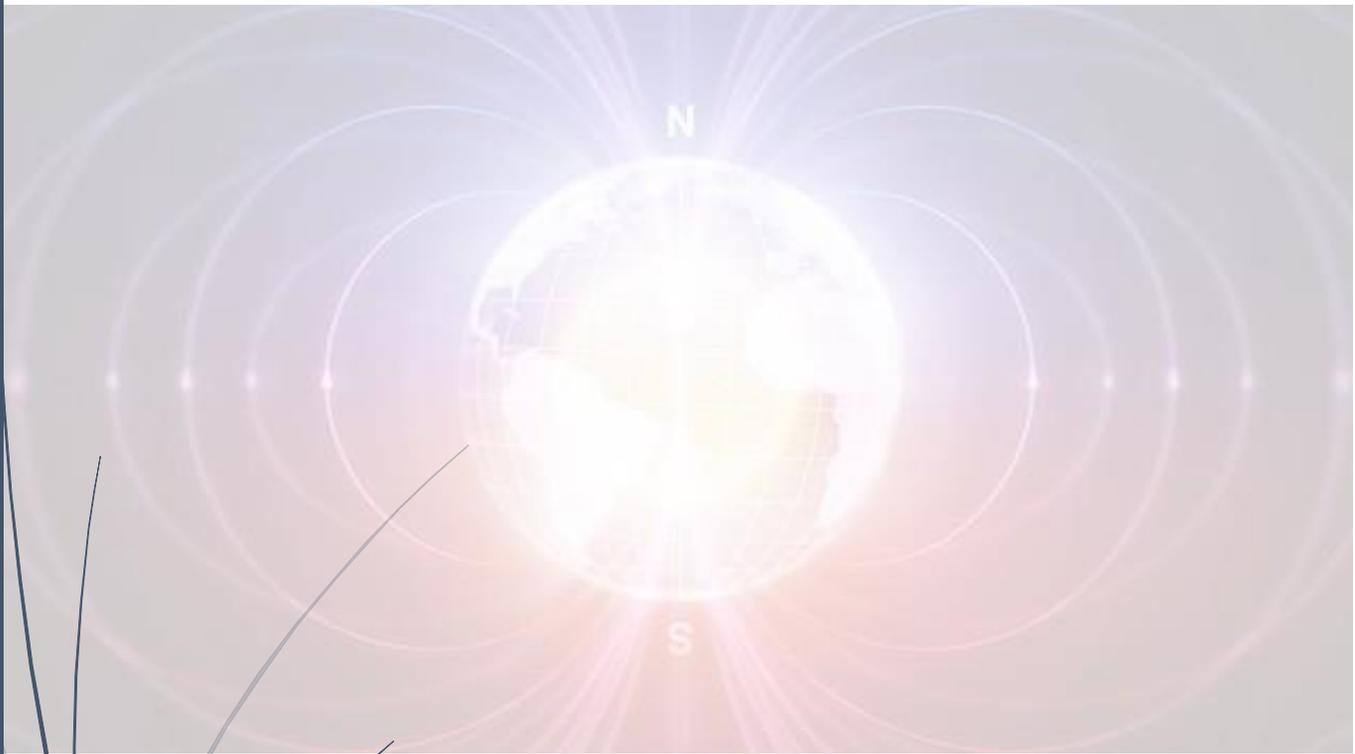
- [1] Point of Care Diagnostics Market Size, Share | 2022 - 27 | MarketsandMarkets n.d. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/point-of-care-diagnostic-market-106829185.html>.
- [2] Syedmoradi L, Norton ML, Omidfar K. Point-of-care cancer diagnostic devices: From academic research to clinical translation. *Talanta* 2021;225:122002. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122002>.
- [3] Walper SA, Lasarte Aragonés G, Sapsford KE, Brown CW, Rowland CE, Breger JC, et al. Detecting Biothreat Agents: From Current Diagnostics to Developing Sensor Technologies. *ACS Sens* 2018;3:1894–2024. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00420>.
- [4] Damborský P, Švítel J, Katrlík J. Optical biosensors. *Essays Biochem* 2016;60:91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>.
- [5] Vermesh O, Mahzabeen F, Levi J, Tan M, Alam IS, Chan CT, et al. A miniaturized optoelectronic biosensor for real-time point-of-care total protein analysis. *MethodsX* 2021;8:101414. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101414>.
- [6] Cho I-H, Kim DH, Park S. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research* 2020;24:6. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>.
- [7] Fermon C, Pannetier-Lecoœur M. Électronique de *spin* et capteurs magnétiques. *Reflats phys* 2010;8–11. <https://doi.org/10.1051/refdp/2010002>.
- [8] Rose-Innes AC, Rhoderick EH. Introduction to Superconductivity. Elsevier Science & Technology Books; 1978.
- [9] Enpuku K, Inoue K, Soejima K, Yoshinaga K, Kuma H, Hamasaki N. Magnetic Immunoassays Utilizing Magnetic Markers and a High-Tc SQUID n.d.:4.
- [10] Paulson DN, Fagaly RL, Toussaint RM, Fischer R. Biomagnetic susceptometer with SQUID instrumentation. *IEEE Transactions on Magnetics* 1991;27:3249–52. <https://doi.org/10.1109/20.133904>.
- [11] Knuutila J. Magnetoencephalography - the Use of Multi-SQUID Systems for Noninvasive Brain Research. *Physica Scripta* 2007;1988:306. <https://doi.org/10.1088/0031-8949/1988/T23/056>.
- [12] Manandhar P, Chen K-S, Aledealat K, Mihajlović G, Yun CS, Field M, et al. The detection of specific biomolecular interactions with micro-Hall magnetic sensors. *Nanotechnology* 2009;20:355501. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/35/355501>.
- [13] Tekgül A, Alper M, Kockar H. Simple electrodepositing of CoFe/Cu multilayers: Effect of ferromagnetic layer thicknesses. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2017;421:472–6. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.06.039>.
- [14] Tsang CH, Fontana RE, Lin T, Heim DE, Gurney BA, Williams ML. Design, fabrication, and performance of spin-valve read heads for magnetic recording applications. *IBM Journal of Research and Development* 1998;42:103–16. <https://doi.org/10.1147/rd.421.0103>.

- [15] Makarov A, Windbacher T, Sverdlov V, Selberherr S. CMOS-compatible spintronic devices: a review. *Semicond Sci Technol* 2016;31:113006. <https://doi.org/10.1088/0268-1242/31/11/113006>.
- [16] Borole UP, Subramaniam S, Kulkarni IR, Saravanan P, Barshilia HC, Chowdhury P. Highly sensitive giant magnetoresistance (GMR) based ultra low differential pressure sensor. *Sensors and Actuators A: Physical* 2018;280:125–31. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.07.022>.
- [17] Park JJ, Reddy KSM, Stadler B, Flatau A. Magnetostrictive Fe–Ga/Cu Nanowires Array With GMR Sensor for Sensing Applied Pressure. *IEEE Sensors J* 2017;17:2015–20. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2017.2657789>.
- [18] Ouyang Y, Wang Z, Zhao G, Hu J, Ji S, He J, et al. Current sensors based on GMR effect for smart grid applications. *Sensors and Actuators A: Physical* 2019;294:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2019.05.002>.
- [19] Giraud M. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante n.d.:170.
- [20] Giraud M, Delapierre F-D, Wijkhuisen A, Bonville P, Thévenin M, Cannies G, et al. Evaluation of In-Flow Magnetoresistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool. *Biosensors* 2019;9:105. <https://doi.org/10.3390/bios9030105>.
- [21] Denmark DJ, Bustos-Perez X, Swain A, Phan M-H, Mohapatra S, Mohapatra SS. Readiness of Magnetic Nanobiosensors for Point-of-Care Commercialization. *J Electron Mater* 2019;48:4749–61. <https://doi.org/10.1007/s11664-019-07275-7>.
- [22] Emilio MDP. GMR Technology For Automotive Applications. *EE Times Europe* 2020. <https://www.eetimes.eu/gmr-technology-for-automotive-applications/>.
- [23] Baselt DR, Lee GU, Natesan M, Metzger SW, Sheehan PE, Colton RJ. A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosens Bioelectron* 1998;13:731–9. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(98\)00037-2](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(98)00037-2).
- [24] Fermon C. *Nanomagnetism: Applications and Perspectives*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2017.
- [25] Su D, Wu K, Saha R, Peng C, Wang J-P. *Advances in Magnetoresistive Biosensors*. *Micromachines* 2020;11:34. <https://doi.org/10.3390/mi11010034>.
- [26] Moyano A, Serrano-Pertierra E, Salvador M, Martínez-García JC, Rivas M, Blanco-López MC. Magnetic Lateral Flow Immunoassays. *Diagnostics* 2020;10:288. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>.
- [27] Lin G, Makarov D, Schmidt OG. Magnetic sensing platform technologies for biomedical applications. *Lab on a Chip* 2017;17:1884–912. <https://doi.org/10.1039/C7LC00026J>.
- [28] Ferreira HA, Graham DL, Parracho P, Soares V, Freitas PP. Flow velocity measurement in microchannels using magnetoresistive chips. *IEEE Transactions on Magnetics* 2004;40:2652–4. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2004.830403>.
- [29] Mujika M, Arana S, Castaño E, Tijero M, Vilares R, Ruano-López JM, et al. Magnetoresistive immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 including a microfluidic network. *Biosens Bioelectron* 2009;24:1253–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.024>.

- [30] Graham DL, Ferreira HA, Freitas PP. Magnetoresistive-based biosensors and biochips. *Trends Biotechnol* 2004;22:455–62. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.06.006>.
- [31] Tondra MC, Bardell RL, Datta P. Microfluidic package design for magnetoresistive biosensors. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2009;2009:5428–31. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2009.5332478>.
- [32] Loureiro JFQ. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO n.d.:253.
- [33] Loureiro J, Fermon C, Pannetier-Lecoœur M, Arrias G, Ferreira R, Cardoso S, et al. Magnetoresistive Detection of Magnetic Beads Flowing at High Speed in Microfluidic Channels. *IEEE Transactions on Magnetics* 2009;45:4873–6. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2009.2026287>.
- [34] Zulkifli SN, Rahim HA, Lau W-J. Detection of contaminants in water supply: A review on state-of-the-art monitoring technologies and their applications. *Sens Actuators B Chem* 2018;255:2657–89. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.078>.



1 - Principes et rappels généraux



Maikane DEROO

1.1. Table des figures & tableaux

Fig. 1.1 - Schéma d'un anticorps de type IgG	39
Fig. 1.2 - Protocole de production d'anticorps monoclonaux [2].....	41
Fig. 1.3 - Principe du test bandelette.....	43
Fig. 1.4 - Principe du test ELISA sandwich.....	44
Fig. 1.5 - Principe de la cytométrie en flux.....	45
Fig. 1.6 - Matériaux diamagnétiques.....	46
Fig. 1.7 - Matériaux paramagnétiques	47
Fig. 1.8 - Matériaux ferromagnétiques.....	48
Fig. 1.9 - Matériaux antiferromagnétiques et ferrimagnétiques.....	48
Fig. 1.10 - Direction de facile aimantation et barrière d'anisotropie.....	49
Fig. 1.11 - Matériaux superparamagnétiques	49
Fig. 1.12 - Spin de l'électron [13]	50
Fig. 1.13 - Principe de l'effet GMR	51
Fig. 1.14 - Principe de la vanne de spin.....	52
Fig. 1.15 - Composition et géométrie des capteurs GMR	53
Fig. 1.16 - Courbe de sensibilité détaillée	55
Fig. 1.17 - Schéma de l'application d'un champ biais transverse (à gauche) ou longitudinal (à droite) et effet sur la courbe de sensibilité.....	55
Fig. 1.18 - Principe de la biopuce à un étage GMR	60
Tableau 1.1 - Caractéristiques des capteurs GMR utilisés pour nos expériences	58

Cette thèse consiste à développer un laboratoire sur puce à base de capteurs magnétiques pour la détection d'objets biologiques. Après une première partie sur des rappels concernant le principe de l'immunodétection et la présentation des tests de diagnostic déjà existants, nous rappellerons quelques notions de magnétisme puis nous détaillerons le principe de fonctionnement des capteurs à magnétorésistance géante et pour finir, nous parlerons des biopuces à base de capteurs GMR déjà développées.

1.2. Principe de l'immunodétection

L'immunodétection comprend toute technique de détection d'un agent biologique au moyen d'anticorps. Cela peut être une détection qualitative (présence/absence) ou un dosage quantitatif (détermination de la concentration en agent biologique) rendus possible grâce à une interaction spécifique entre un/des anticorps et leur antigène cible, couplée à un système de révélation (impliquant une enzyme, un fluorophore, une nanoparticule colorée, etc.). Par ces techniques, il est possible de détecter des protéines (toxines, anticorps, hormones, récepteurs en surface de bactéries ou de cellules, etc.), des acides nucléiques (ADN), des lipides ou des glucides (exemple : lipopolysaccharide (LPS), composant de la membrane externe de certaines bactéries).

1.2.1. Les anticorps

1.2.1.1. Description des anticorps

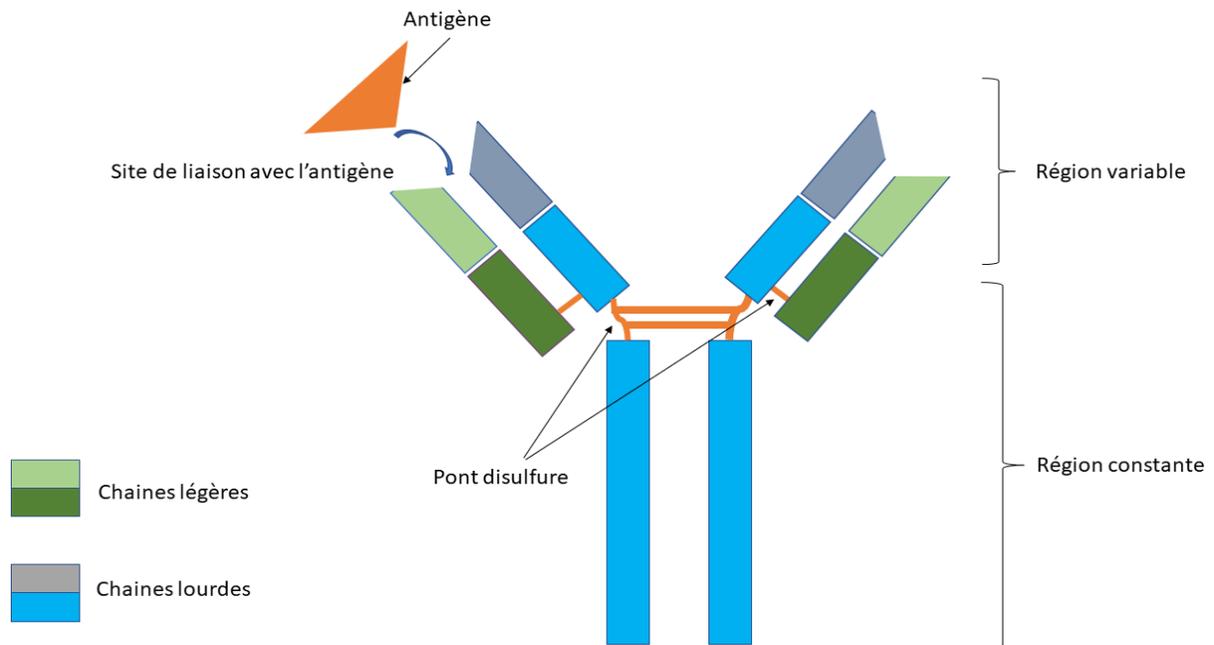


Fig. 1.1 - Schéma d'un anticorps de type IgG

Un anticorps est composé de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes, chacune constituée d'une partie variable et d'une partie constante. La liaison antigène-anticorps est également représentée.

Un anticorps (ou immunoglobuline, Ig) est une glycoprotéine produite et utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser de manière spécifique un agent biologique pathogène, nommé antigène. Il existe cinq types d'anticorps (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD, selon leur quantité respective dans

l'organisme) ayant des structures, des localisations et des fonctions différentes [1] [2]. Les anticorps majoritairement utilisés en immunodétection et en thérapeutique sont les IgG. Ces derniers sont représentés sous la forme schématique d'un Y (Fig. 1.1) et composés de quatre chaînes peptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, reliées par des ponts disulfures. Chacune de ces chaînes peptidiques possède une partie constante (i.e. relativement commune entre IgGs d'une même espèce) et une partie variable (constituant le site de liaison spécifique à la cible biologique). Chaque anticorps reconnaît spécifiquement un antigène précis (i.e. molécule biologique capable d'induire une réponse immunitaire) et peut en fixer deux simultanément. La partie de l'antigène à laquelle se fixe l'anticorps est appelée l'épitope et, en miroir, la partie de l'anticorps qui reconnaît l'antigène est nommée paratope. Les interactions entre l'épitope et le paratope ne sont pas de nature covalente mais ionique, hydrophobe, électrostatique et/ou de type forces de Van der Waals ... avec des formes géométriques complémentaires dans l'espace (exemple : cavité + protubérance, surface saillante + bilboquet etc.). On comprend donc aisément que la liaison entre l'anticorps et l'antigène puisse dépendre du milieu dans lequel ils se trouvent (pH, force ionique, etc.).

On peut mesurer la force d'interaction entre l'épitope et le paratope : c'est ce que l'on appelle l'affinité de l'anticorps. L'affinité est définie par deux critères : la vitesse d'association de l'anticorps à sa cible et sa vitesse de dissociation. L'affinité est un équilibre entre cette association et cette dissociation.

Il est possible de produire un grand nombre de dérivés d'IgG, comme des fragments d'anticorps appelés F(ab) ou F(ab')₂ (paragraphe 3.4.2.2.2).

1.2.1.2. Production des anticorps

En réponse à l'introduction d'un antigène étranger dans l'organisme, les lymphocytes B du système immunitaire produisent des anticorps. A ce stade, il s'agit d'un mélange d'anticorps, qui réagissent tous contre un antigène spécifique, mais chacun reconnaissant un épitope différent, dans l'objectif d'une détection et d'une neutralisation plus efficace de la cible pathogène. On parle d'anticorps polyclonaux (i.e. produits par différents clones (i.e. lignées) de lymphocytes B). Ces anticorps polyclonaux, fortement réactifs envers l'antigène, peuvent être utilisés en immunodétection mais ils présentent un certain nombre d'inconvénients. Les anticorps polyclonaux sont produits chez l'animal (lapin, cheval etc.) suite à des injections répétées de l'antigène et prélèvements sanguins (contenant les anticorps polyclonaux), et à ce titre, il existe une forte variabilité d'un lot d'anticorps polyclonaux à un autre. De plus, chaque lot existe en quantité finie. D'autre part, les réactions croisées sont possibles, c'est à dire la possibilité que les anticorps polyclonaux reconnaissent de façon non spécifique d'autres cibles biologiques (au vu de la diversité de ces anticorps très nombreux).

A ces anticorps polyclonaux, on oppose les anticorps monoclonaux. Ces derniers sont issus des premiers par technique d'hybridation lymphocytaire (ou fusion) ([3] et Fig. 1.2) suivi d'un isolement sélectif de chaque clone producteur d'un seul type d'anticorps, autrement dit d'anticorps monoclonal. Les anticorps monoclonaux sont donc des anticorps produits par une même lignée de lymphocyte B (ils sont tous identiques) et ils reconnaissent le même épitope. Malgré une affinité moindre, les anticorps monoclonaux offrent l'avantage de la pureté, de la constance, d'une source continue (infinie) et d'une moindre réactivité croisée.

La production des anticorps monoclonaux se réalise en plusieurs étapes [2] [3] (Fig. 1.2).

La première étape se fait en animalerie et consiste à immuniser des animaux (souvent des souris), autrement dit à inoculer l'antigène à l'animal de laboratoire de façon répétée. Cela a pour effet d'induire la production de lymphocytes B libérant des anticorps polyclonaux contre l'antigène dans la circulation sanguine. Un échantillon de sang de ces souris est analysé afin de vérifier la présence des anticorps d'intérêt.

Après sacrifice de l'animal, les lymphocytes B de la rate produisant les anticorps sont isolés rapidement (les lymphocytes B ne sont pas cultivables *in vitro*) puis fusionnés, en présence de polyéthylène glycol (PEG, qui permet la fusion des membranes cellulaires), avec des cellules de myélome (cellules cancéreuses). Cette manipulation permet d'obtenir, en milieu sélectif, des hybridomes producteurs d'anticorps capables de croissance illimitée *in vitro*. Ensuite, ces hybridomes sont clonés (par dilution limite ou par tri cellulaire) et les cellules clonales stables productrices d'anticorps monoclonaux d'intérêt sont sélectionnées puis amplifiées. Il suffit pour finir d'expandre les clones d'hybridomes produisant les anticorps souhaités, soit par culture cellulaire, soit en injectant les cellules clonales directement aux souris, afin de produire de grande quantité d'anticorps (qu'il reste alors à purifier avant utilisation).

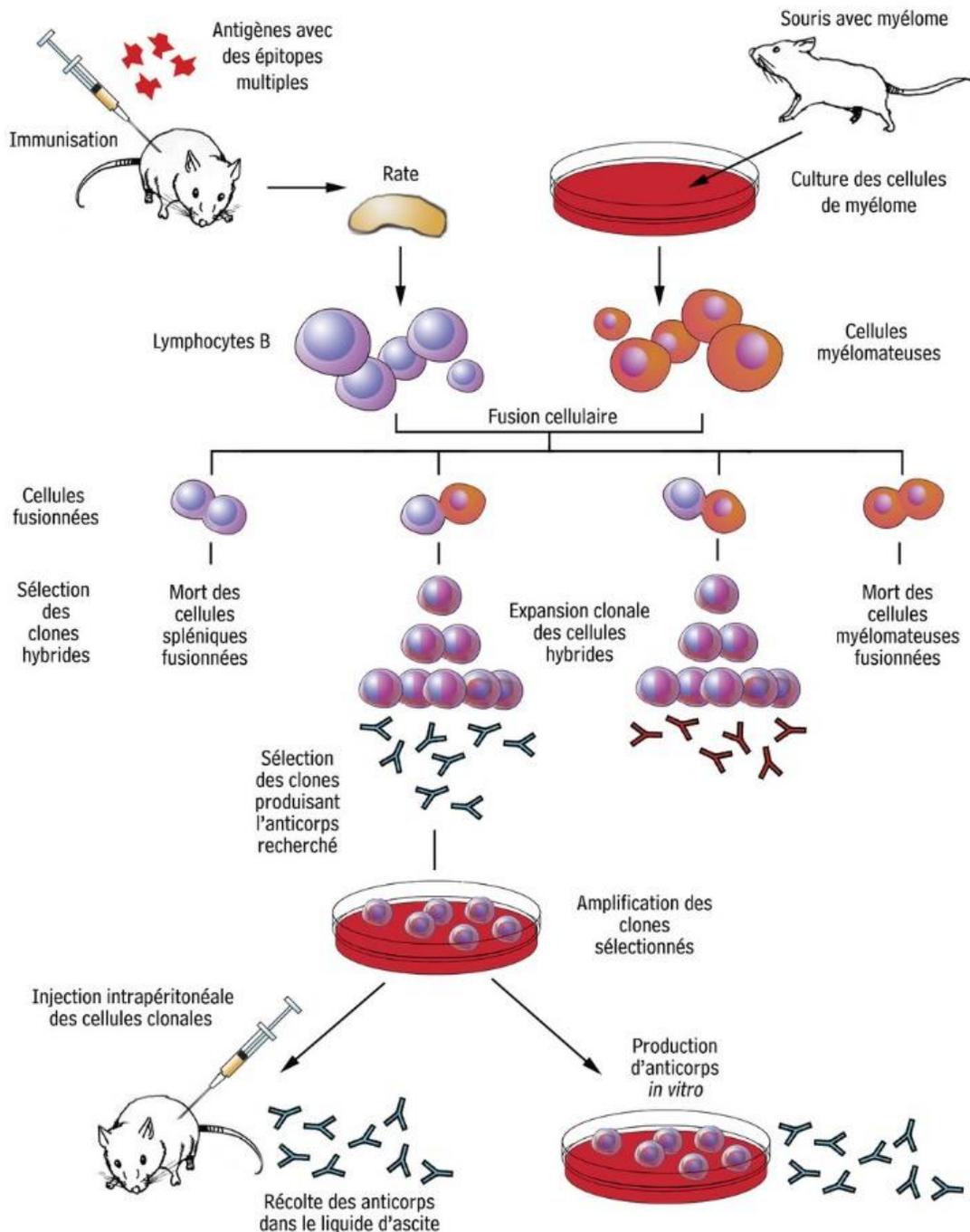


Fig. 1.2 - Protocole de production d'anticorps monoclonaux [2]

1.2.2. Utilisation des anticorps en immunodétection

Dans cette partie, sont présentés les tests d'immunodétection utilisés lors de mes travaux de thèse afin de détecter la présence des cellules NS1 et pouvoir ensuite comparer la sensibilité de ces tests à celle obtenue sur la biopuce GMR développée ([paragraphe 4.2.4](#)).

1.2.2.1. Tests immunochromatographiques (tests bandelettes)

Les tests bandelettes, aussi appelés tests immunochromatographiques (ou Lateral Flow Immunoassays, LFA), reposent sur une technique d'immunodiagnostic simple et rapide basée sur la migration d'un échantillon à travers une membrane de nitrocellulose pour détecter une cible biologique en quelques minutes. Depuis la crise sanitaire du Covid-19, ces tests (tests antigéniques ou autotests) ont été très largement utilisés et sont désormais bien connus du grand public. Ils sont aussi utilisés à grande échelle pour les tests de grossesse. Ils sont composés de 3 zones, ayant chacune une fonction :

- Une membrane de nitrocellulose qui, au-delà de sa fonction de support de migration de l'échantillon, permet l'immobilisation d'anticorps.
- Un premier tampon (dit « sample pad ») permet l'absorption de l'échantillon et le stockage d'anticorps couplés au système de révélation. Il est situé à une extrémité de la membrane de nitrocellulose.
- Un deuxième tampon (dit « tampon absorbant ») permet d'assurer la migration de l'échantillon par capillarité dans la membrane de nitrocellulose, en fonctionnant comme une « pompe » située à l'autre extrémité de la bandelette.

Trois réactifs biologiques sont également utilisés :

- Un premier anticorps (monoclonal de souris) dirigé contre la cible biologique d'intérêt, immobilisé sur la membrane de nitrocellulose, et qui permettra la formation de la ligne spécifique (ligne test).
- Un deuxième anticorps (monoclonal de souris) dirigé contre la cible biologique d'intérêt, couplé à un système de révélation, à savoir des nanoparticules d'or colloïdal de couleur rouge. Cet anticorps marqué permettra d'assurer la révélation visuelle de la cible d'intérêt (ligne test) et la visualisation de la ligne de contrôle une fois ajouté à l'échantillon.
- Des anticorps dirigés contre les anticorps marqués qui permettront la formation de la ligne de contrôle. Il s'agit, par exemple, d'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris.

Un test bandelette nous donne un résultat qualitatif (positif/négatif) ou semi-quantitatif sous la forme d'une ou de deux lignes colorées, résultant de la formation (ou non) du complexe anticorps-antigène. Observons plus en détail ce qu'il se passe lors de la réalisation d'un test bandelette ([Fig. 1.3](#)).

L'échantillon est déposé sur le premier tampon permettant l'absorption de l'échantillon. L'échantillon migre ensuite par capillarité le long de la bandelette. Si la cible biologique n'est pas présente dans l'échantillon, l'anticorps anti-cible marqué à l'or colloïdal ne se lie pas à elle, ni à la ligne test (où sont immobilisés d'autres anticorps anti-cibles). L'anticorps anti-cible marqué ne se lie alors qu'à la ligne contrôle (ligne où des anticorps de chèvre anti-Ig de souris sont immobilisés). Une seule ligne apparaît donc (ligne contrôle) : le test est négatif.

Par contre, si la cible biologique est présente dans l'échantillon, l'anticorps anti-cible marqué se lie à elle lors de la migration capillaire. Puis le complexe cible/anticorps anti-cible marqué continuera sa migration

le long de la membrane de nitrocellulose avant de se fixer à la ligne test (où la cible biologique est prise en sandwich entre l'anticorps anti-cible immobilisé et l'anticorps anti-cible marqué). L'excès d'anticorps anti-cible marqué se lie également à la ligne contrôle. Deux lignes apparaissent (ligne test et ligne contrôle) : le test est positif.

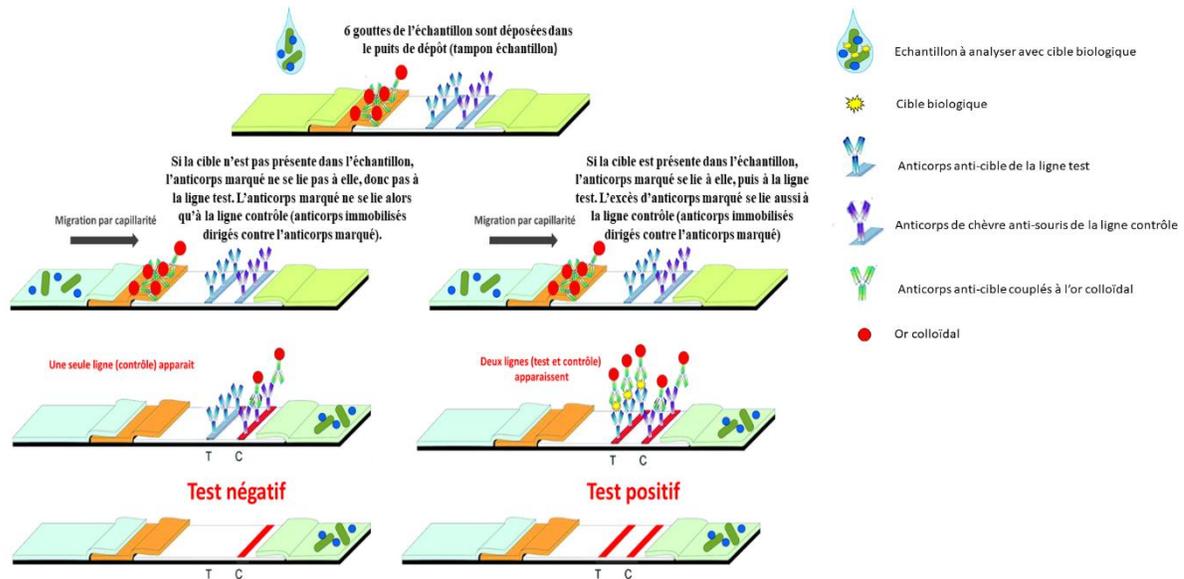


Fig. 1.3 - Principe du test bandelette

Présentation du fonctionnement d'un test négatif (à gauche) et d'un test positif (à droite).

Dans le cas du test bandelette destiné à la détection des cellules NS1 (dans le cadre des travaux de thèse), l'anticorps immobilisé sur la ligne test de la membrane de cellulose est l'anticorps anti-CD138. L'anticorps de révélation est également l'anticorps anti-CD138, couplé à des nanoparticules d'or colloïdal.

Ces tests ont l'avantage d'être rapides, faciles à utiliser et transportables. Cependant, ils ne sont souvent pas adaptés aux objets de grande taille comme les cellules ou certaines bactéries qui ont du mal à migrer dans la membrane de nitrocellulose. Enfin, leur plus grande faiblesse repose sur leur manque de sensibilité, étant donné que le signal visible à l'œil nu correspond à une accumulation du signal colorimétrique réel (sans amplification).

1.2.2.2. Test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Le test ELISA (littéralement « technique d'immunoabsorption par enzyme liée ») est une technique immuno-enzymatique qui permet de détecter et quantifier une cible biologique spécifique (cellules, bactéries, protéines, etc.) contenue dans une solution en utilisant un support solide (exemple : plaque 96 puits). Sur ce support solide est immobilisé l'antigène ou l'anticorps, ce qui permet de réaliser des étapes de lavage avant révélation de la présence complexe anticorps-antigène au moyen d'une enzyme (acétylcholinestérase, peroxydase de Raifort, phosphatase alcaline etc.). De nombreux tests ELISA commerciaux sont utilisés en routine dans les laboratoires d'analyse médicale, entre autres, celui pour diagnostiquer l'infection par le VIH, pour les tests de confirmation de grossesse et pour le typage sanguin. Les tests ELISA sont beaucoup plus sensibles que les tests bandelettes (étant donné que le signal correspond à une amplification du signal réel grâce à la réaction enzymatique). Mais, en contrepartie, le temps de réaction est plus long et ces tests ELISA nécessitent un personnel qualifié.

Il existe quatre types de test ELISA : direct (antigène immobilisé), indirect (antigène immobilisé), compétitif (antigène ou anticorps immobilisé) et sandwich (anticorps immobilisé). La méthode directe

consiste à immobiliser un antigène connu, puis à ajouter l'anticorps dirigé contre l'antigène directement couplé à une enzyme. Avec la méthode indirecte, ce sont des anticorps secondaires qui sont couplés à l'enzyme, qui se lient à l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène. La troisième méthode se fait par compétition de liaison pour un mélange d'anticorps (ou respectivement d'antigènes) marqués et d'anticorps (ou resp. d'antigènes) à doser non marqués. Mais, dans ces travaux de thèse, c'est le test ELISA sandwich (Fig. 1.4) qui a été utilisé afin de détecter les cellules NS1.

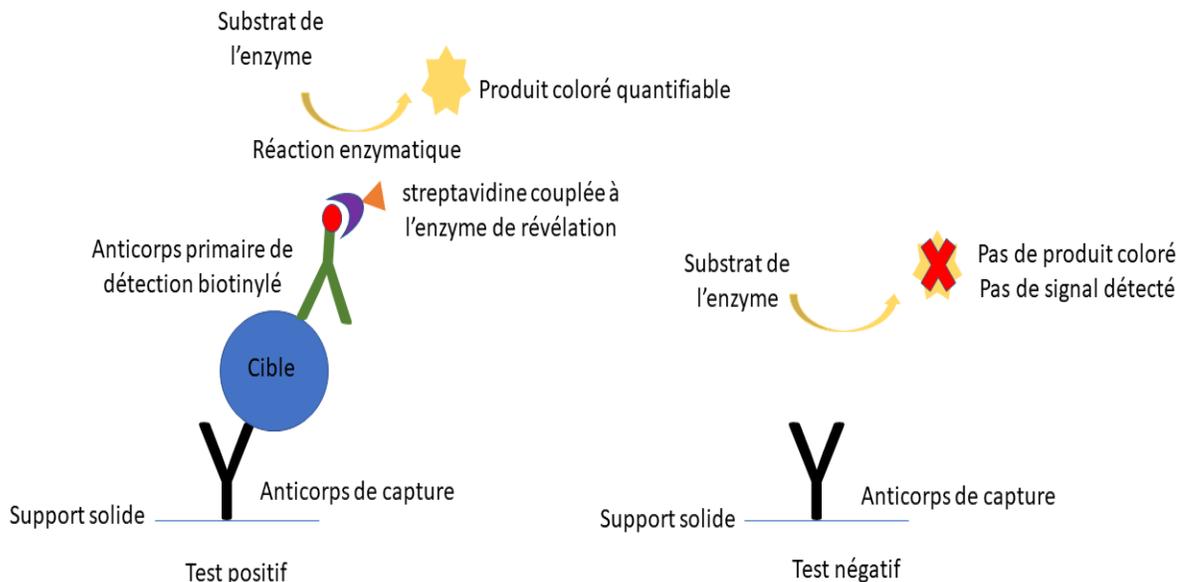


Fig. 1.4 - Principe du test ELISA sandwich

Présentation d'un test positif (à gauche) et d'un test négatif (à droite).

Pour ce test ELISA sandwich, des anticorps spécifiques de l'antigène cible sont utilisés. Ainsi, un anticorps immobilisé sur le support solide, dit « anticorps de capture » (ici, anticorps anti-CD138), va permettre la capture spécifique de sa cible (ici les cellules NS1) présente dans l'échantillon à analyser. Après lavages du support solide, l'anticorps dit « anticorps primaire de détection » (ici, anticorps anti-CD138 biotinylés) permettra, après l'ajout du système secondaire de révélation (streptavidine couplée à l'enzyme peroxydase ou à l'enzyme acétylcholinestérase), de détecter et quantifier la présence de la cible (cellules NS1). En effet, le substrat de l'enzyme (ici, 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ou réactif d'Ellman) sera converti par l'enzyme (peroxydase de Raifort (poly-HRP) ou acétylcholinestérase (G₄)) en un produit coloré (bleu, qui passe au jaune après ajout d'acide sulfurique pour l'enzyme poly-HRP ou en jaune pour l'enzyme G₄), dont la quantification se fera par spectrophotométrie (ici, mesure de l'absorbance à 450 nm pour le TMB acidifié et à 414 nm pour l'Ellman). Evidemment des étapes de lavage sont nécessaires avant la révélation afin d'éliminer les anticorps de détection dans le cas où la cible ne serait pas présente dans l'échantillon [4] [5].

1.2.2.3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'immunodétection (Fig. 1.5) qui fonctionne sur le principe de la diffusion et de la réfraction de la lumière ainsi que de l'émission de fluorescence. Elle permet de mesurer, dans une solution de particules (de grosses tailles : cellules, bactéries, parasites, billes etc.), les caractéristiques individuelles de chaque objet telles que la taille, la structure et la granularité, ainsi que la présence ou absence de tout marqueur de surface pouvant être détecté par un composé fluorescent. En effet,

dans le principe, les particules en suspension passent une à une devant un (ou plusieurs) faisceau(x) laser et des détecteurs captent les signaux émis par chacune d'elle :

- La lumière diffusée dans l'axe du laser (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules,
- La lumière réfractée à 90°C (Side Scatter, SSC) qui renseigne sur la structure et la granularité des particules,
- Les signaux de fluorescence émis par la particule elle-même (autofluorescence) ou par la fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome qui se lie spécifiquement à la particule.

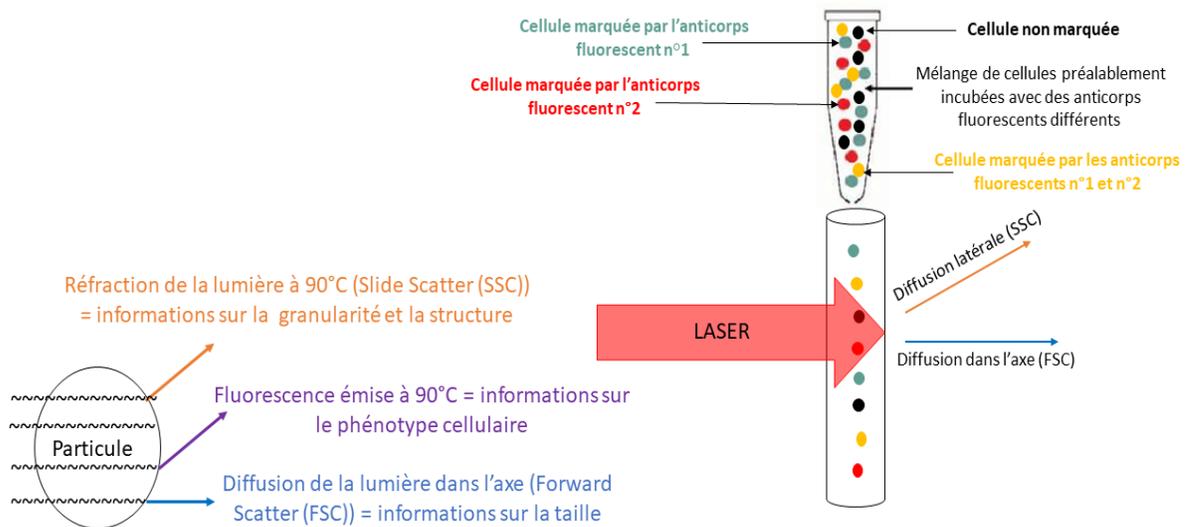


Fig. 1.5 - Principe de la cytométrie en flux

Schéma modifié de [7].

Cependant, cette technique, utilisée dans les hôpitaux et les laboratoires, est assez coûteuse, nécessite un équipement assez volumineux, et du personnel expert qualifié à son utilisation complexe [6] [7].

Dans notre cas, le test en cytométrie en flux nous a permis, entre autres, de vérifier la présence à la surface des cellules NS1 du récepteur CD138 (cible des anticorps anti-CD138).

1.3. Rappels de magnétisme

Dans le cas de nos expériences, des billes superparamagnétiques sont utilisées pour marquer des objets biologiques détectés avec des capteurs à magnétorésistance géante. Après des rappels généraux très succincts sur différentes formes de magnétisme, nous détaillerons donc un peu plus le superparamagnétisme.

Lorsqu'un champ magnétique \vec{H} est appliqué à un matériau, celui-ci s'aimante plus ou moins facilement, c'est ce qu'on appelle la susceptibilité magnétique χ_m . Le champ magnétique \vec{B} résultant du champ magnétique appliqué \vec{H} et de l'aimantation \vec{M} s'écrit alors (Eq. 1.1):

$$\vec{M} = \chi_m \vec{H}$$

(Eq. 1.1)

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) = \mu_0 \vec{H}(1 + \chi_m) \text{ avec } \mu_0 \text{ la perméabilité du vide}$$

1.3.1. Diamagnétisme

Le diamagnétisme existe dans tous les matériaux. Elle peut être comparée à la loi de Lenz en électromagnétisme qui montre que quand on applique une variation de flux dans un circuit électrique, il y a création d'un courant opposé pour la compenser.

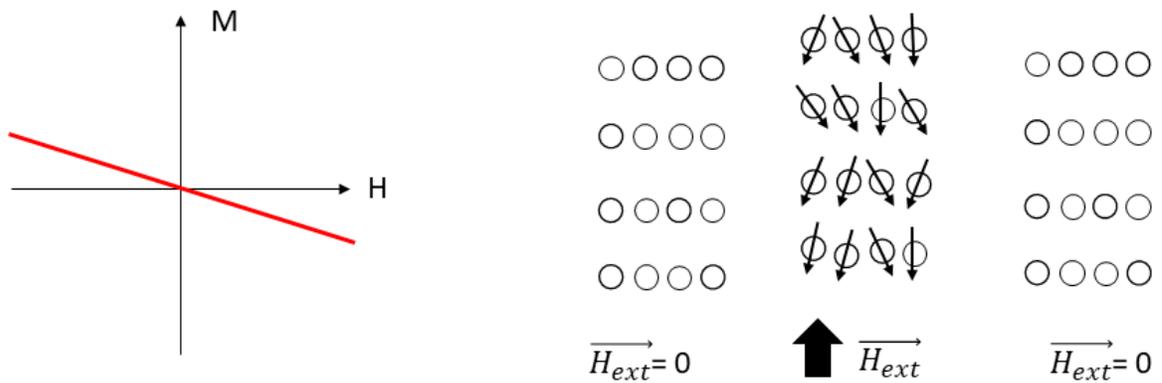


Fig. 1.6 - Matériaux diamagnétiques

Matériaux qui ne sont pas attirés par les champs magnétiques.

Dans le cas du diamagnétisme, lorsqu'un champ magnétique est appliqué à un matériau, le mouvement orbital des électrons est affecté, et un faible moment magnétique est induit, de direction opposée et proportionnel au champ magnétique appliqué (Fig. 1.6). La réponse diamagnétique des matériaux est faible et souvent négligeable lorsqu'une autre composante magnétique est présente dans le matériau, comme le paramagnétisme, le ferromagnétisme ou l'antiferromagnétisme. L'eau, l'or, le bismuth, le cuivre et le mercure sont des matériaux diamagnétiques.

1.3.2. Paramagnétisme

Les matériaux paramagnétiques, sont caractérisés par des atomes avec des couches électroniques incomplètes, possédant un moment magnétique permanent qui s'aligne dans la direction d'un champ magnétique appliqué en générant une aimantation. Quand on coupe ce champ magnétique appliqué, les moments magnétiques se remettent à fluctuer librement et l'aimantation globale devient nulle à cause de l'agitation thermique (Fig. 1.7).

Quand les distances entre les atomes magnétiques sont faibles (de l'ordre de l'Angstrom) et qu'ils peuvent interagir, les matériaux peuvent devenir magnétiquement ordonnés en dessous d'une température caractéristique. Deux exemples de ces ordres, le ferromagnétisme et l'antiferromagnétisme, sont décrits ci-dessous. Au-dessus de cette température, l'agitation thermique est plus grande que l'ordre magnétique et le matériau revient à une phase paramagnétique.

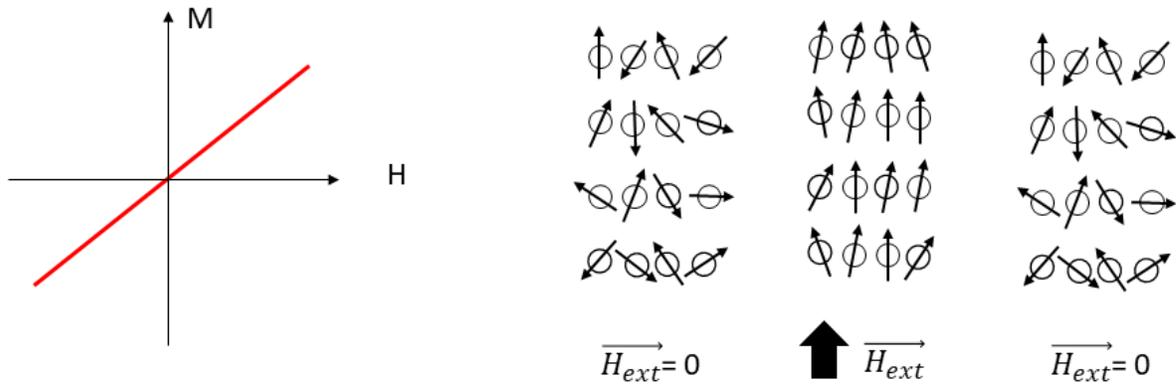


Fig. 1.7 - Matériaux paramagnétiques

Matériaux qui possèdent une aimantation globale nulle à champ nul mais qui sous l'effet d'un champ magnétique extérieur acquiert une aimantation qui tend à s'aligner dans le sens du champ appliqué.

1.3.3. Ferromagnétisme

Certains matériaux comme par exemple le fer, le cobalt, le nickel etc., possèdent en dessous d'une température caractéristique appelée température de Curie T_C , une aimantation permanente en l'absence de champ magnétique extérieur. Au-dessus, de cette température, ils redeviennent paramagnétiques.

Cette aimantation permanente provient d'une interaction d'échange entre les moments magnétiques qui les aligne. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, il tend à aligner l'aimantation avec le champ (énergie Zeeman) et donc à renverser la direction de l'aimantation. Le renversement dépend aussi de l'anisotropie magnétique présente dans le matériau magnétique et qui peut être due à la cristallinité du matériau (énergie magnéto cristalline induite par le couplage spin-orbit) ou par la forme du matériau (énergie magnétostatique due à la présence de champs de fuite que le matériau cherche à diminuer). Par exemple, l'aimantation dans un film magnétique tend à s'aligner dans le plan et si la forme est un barreau, l'aimantation tend à s'aligner selon la longueur de celui-ci [8]. Ces anisotropies sont responsables du cycle d'hystérésis (un cycle typique est présenté en (Fig. 1.8)) du matériau lorsqu'un champ magnétique est appliqué afin de renverser l'aimantation de celui-ci. Ce cycle d'hystérésis signifie que pour un champ magnétique appliqué, deux aimantations sont possibles. Grâce à cette courbe d'aimantation, il est possible de connaître plusieurs caractéristiques du matériau comme i) son champ coercitif qui est le champ à appliquer pour retourner l'aimantation à 180° et ii) son aimantation rémanente M_r qui est l'aimantation du matériau si le champ magnétique est coupé.

L'énergie magnétostatique peut être responsable de la création de domaines magnétiques et induire des cycles d'hystérésis plus rond. Ces domaines sont un compromis entre gain d'énergie magnétostatique et coût de la création d'une paroi de domaine [9] (Fig. 1.8).

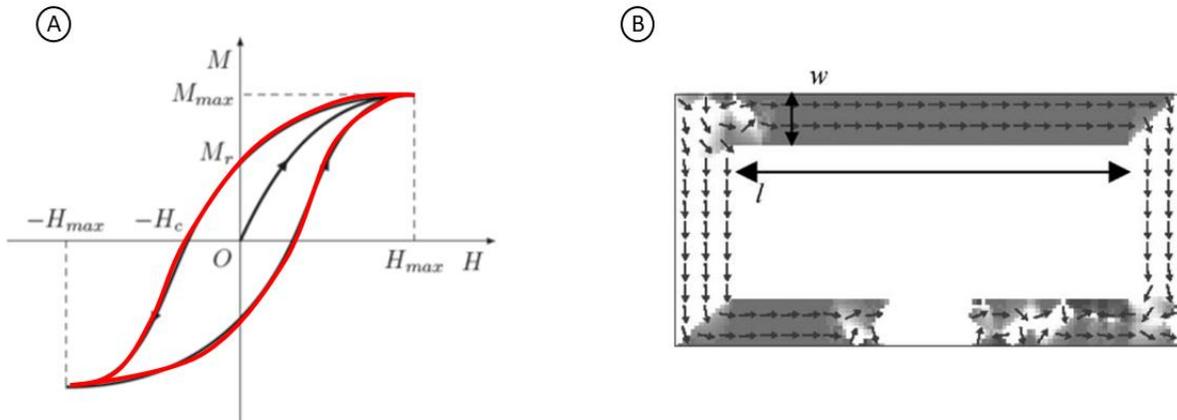


Fig. 1.8 - Matériaux ferromagnétiques

A : Les anisotropies présentes dans le matériau sont responsables de la forme du cycle d'hystérésis. B : Configuration magnétique en forme de yoke après saturation et retour à champ nul. L'aimantation tend à s'aligner selon la longueur et le matériau possède une aimantation rémanente lorsque le champ est coupé [8].

1.3.4. Antiferromagnétisme et ferrimagnétisme

Les matériaux antiferromagnétiques sont caractérisés par un arrangement antiparallèle des moments magnétiques en dessous d'une température caractéristique T_N , appelée température de Néel.

Ils sont constitués de deux sous réseaux dont les moments magnétiques sont égaux mais opposés donc le moment résultant est nul en dessous de T_N en l'absence de champ magnétique appliqué. Au-dessus de T_N , le matériau redevient paramagnétique (Fig. 1.9).

Comme les composés antiferromagnétiques, les matériaux ferrimagnétiques possèdent deux sous réseaux dont les aimantations sont opposées mais ne se compensent pas (Fig. 1.9).

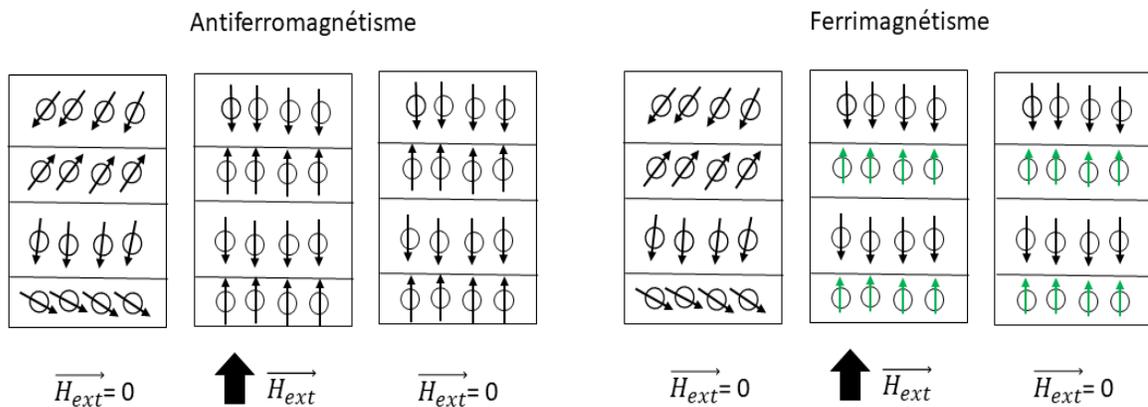


Fig. 1.9 - Matériaux antiferromagnétiques et ferrimagnétiques

L'interaction d'échange mène à un alignement antiparallèle des moments magnétiques. Dans le cas de l'antiferromagnétisme, les moments magnétiques se composent, ce n'est pas le cas pour le ferrimagnétisme.

1.3.5. Superparamagnétisme

Lorsque le matériau magnétique possède une taille réduite, par exemple les nanoparticules magnétiques, l'aimantation devient uniforme et sans domaine magnétique car le coût de création d'une paroi devient trop important. Les autres anisotropies, de forme et magnétocristalline restent présentes et affectent le comportement magnétique de ces structures en le rendant non isotrope. Le retournement de l'aimantation de la particule est conditionné par le passage d'une barrière d'énergie qui dépend de la constante d'anisotropie K et du volume V de la particule (Fig. 1.10) et est activé thermiquement ($K_B T$) [10].

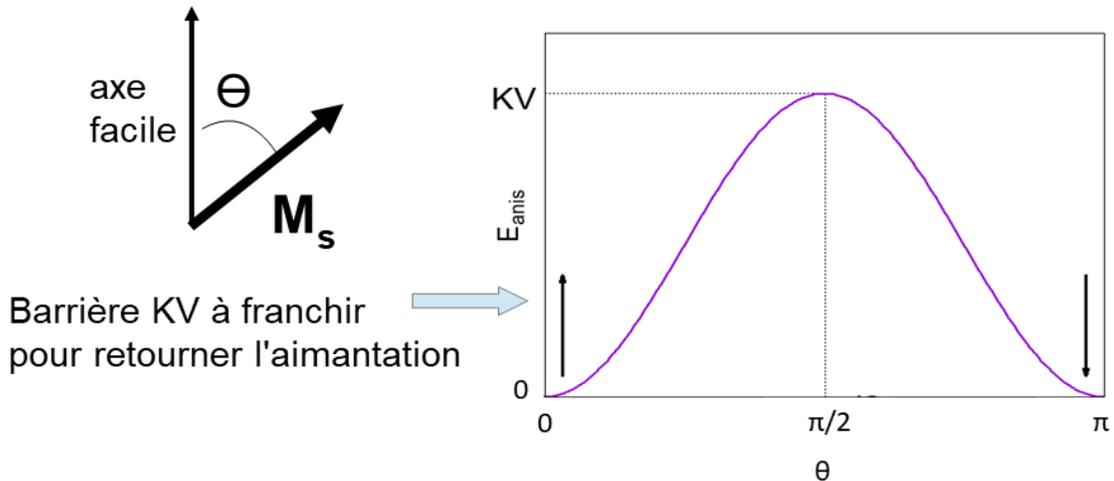


Fig. 1.10 - Direction de facile aimantation et barrière d'anisotropie

Pour les particules ayant une barrière d'énergie équivalente à l'énergie thermique à température ambiante, l'énergie d'anisotropie n'est plus suffisante pour maintenir l'aimantation qui se met alors à fluctuer d'une direction de facile aimantation à une autre avec un temps caractéristique τ_N (temps de Néel) de l'ordre de quelques ns à quelques 100 ns à température ambiante.

Le comportement de l'aimantation est semblable à celui d'un paramagnétique, mais avec un moment fluctuant beaucoup plus grand, d'où l'appellation de régime superparamagnétique (Fig. 1.11). On peut leur appliquer les lois du paramagnétisme, en remplaçant le moment ionique μ par le moment total $n\mu$ ou $M_s V$ de la particule.

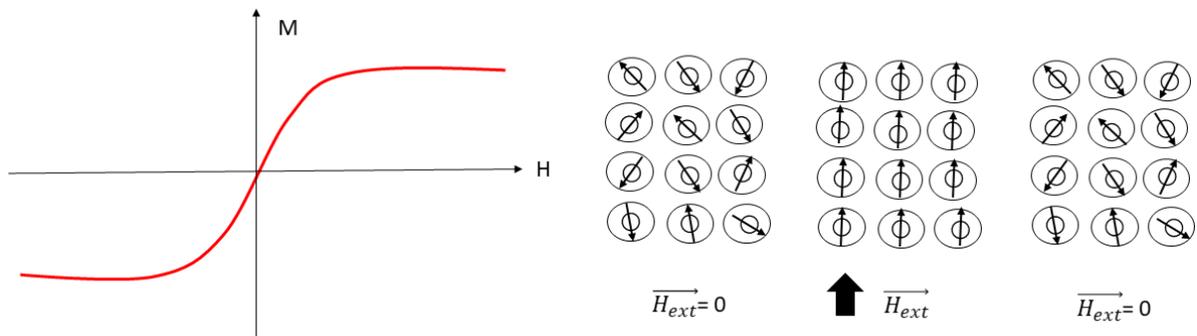


Fig. 1.11 - Matériaux superparamagnétiques

Comportement des matériaux ferromagnétiques de taille nanométriques.

En l'absence de champ magnétique appliqué, l'aimantation est donc globalement nulle sur un temps suffisamment long devant τ_N . Lorsqu'on applique un champ magnétique, l'ensemble des particules magnétiques s'oriente dans le sens du champ extérieur. La valeur du champ nécessaire pour la saturation dépend de la température.

Pour les expériences réalisées lors de ces travaux de thèse, des billes micrométriques ou nanométriques superparamagnétiques sont utilisées.

1.4. Les capteurs à magnétorésistance géante

Le phénomène de magnétorésistance géante fut découvert pour la première fois en 1988 par le français Albert Fert [11] et conjointement par l'allemand Peter Grünberg [12] recevant ainsi un prix Nobel en 2007 pour leur découverte. Ils ont découvert une variation de résistivité importante lorsqu'une alternance de couches nanométriques de Fe et de Cr était soumise à un champ magnétique extérieur.

En effet, les capteurs à magnétorésistance géante permettent de mesurer de très faibles variations de champs magnétiques en mesurant des variations de résistances. Les capteurs GMR sont sensibles à des champs magnétiques de l'ordre du nanotesla permettant ainsi la transduction d'un signal biologique en un signal électrique, avantage considérable par rapport aux systèmes qui utilisent des marqueurs colorimétriques ou fluorescents.

1.4.1. Electronique de spin

Les électrons possèdent deux types de moment angulaire : le moment angulaire orbital, dû à leur mouvement autour du noyau, et un moment intrinsèque (moment magnétique), le spin. Ce spin peut se trouver dans deux états distincts $S = \pm \frac{1}{2}$ (Fig. 1.12) [13].

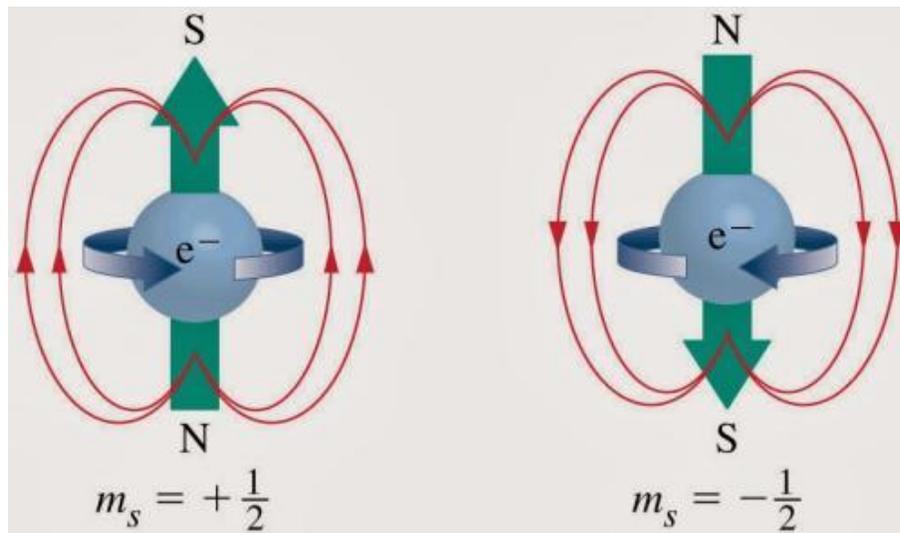


Fig. 1.12 - Spin de l'électron [13]

Le spin de l'électron est soit égal à $+\frac{1}{2}$ soit à $-\frac{1}{2}$.

L'électronique classique guide les électrons en appliquant une force sur leur charge électrique alors que l'électronique de spin les guide en agissant sur le spin de l'électron. Or, l'objectif de la spintronique est de

combiner à la fois la charge et le spin des électrons pour fabriquer des dispositifs dans lesquels ces deux caractéristiques joueront un rôle actif.

1.4.2. Effet GMR

L'origine de la magnétorésistance repose sur le spin des électrons dans des matériaux magnétiques structurés en couches minces.

Dans un matériau ferromagnétique, la conductivité électrique est liée à la mobilité et à la densité d'état des électrons au niveau de Fermi qui est différente pour les deux états de spin de l'électron (Fig. 1.13A). Ainsi, pour les deux directions de spin, la diffusion des électrons n'est pas la même [14].

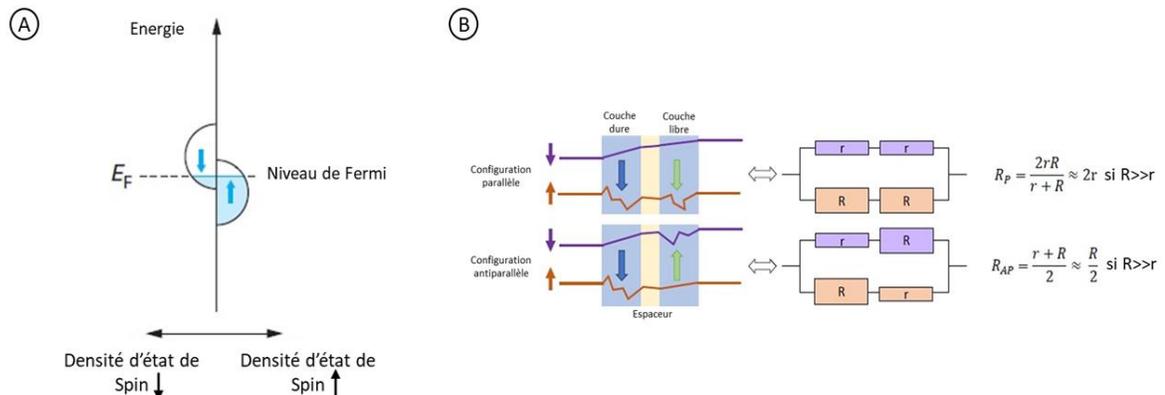


Fig. 1.13 - Principe de l'effet GMR

A : Diagramme de bande d'énergie pour les électrons de spin up et down dans un métal ferromagnétique. Ces deux états sont décalés en énergie. **B :** Configuration parallèle et antiparallèle ainsi que la résistance équivalente d'une structure composée de deux couches ferromagnétiques séparées par une couche conductrice mais non magnétique (séparateur), en considérant le modèle de deux courants [20].

Si l'on prend l'exemple d'un empilement de deux couches ferromagnétiques séparées par une couche conductrice mais non magnétique, la conduction des électrons dans cette structure va dépendre du spin de l'électron par rapport à l'aimantation locale des couches composant cette structure. Il est possible de considérer un modèle à deux courants en parallèle, un courant de spin up et un courant de spin down. Deux états extrêmes peuvent donc être observés : un état parallèle du spin de l'électron par rapport à l'aimantation de la couche ferromagnétique donc une résistance faible ou un état antiparallèle du spin de l'électron par rapport à l'aimantation locale de la couche ferromagnétique possédant alors une résistance élevée (Fig. 1.13B).

Si l'on considère que les deux couches ferromagnétiques ont une aimantation antiparallèle (AP) entre elles, les électrons de spins up (down respectivement) vont traverser une couche ferromagnétique avec une aimantation parallèle (respectivement antiparallèle) par rapport à leur spin et donc avoir une résistance faible r (élevée R respectivement). On peut donc écrire que la résistance totale du dispositif est de :

$$R_{AP} = \frac{1}{2} (r + R) \approx \frac{R}{2} \text{ si } R \gg r \quad \text{(Eq. 1.2)}$$

Si l'on considère cette fois que les deux couches ferromagnétiques ont une aimantation parallèle (P) entre elles, les électrons de spins parallèles vont traverser deux couches ferromagnétiques possédant une aimantation parallèle à leur moment magnétique donc induisant une résistance équivalente faible ($2r$) alors que les électrons de spins antiparallèles vont traverser deux couches ferromagnétiques dont l'aimantation

est cette fois antiparallèle à leur moment magnétique donc la résistance équivalente sera élevée (2R). On peut donc écrire que la résistance totale du dispositif est de :

$$R_p = \frac{2rR}{R+r} \approx 2r \text{ si } R \gg r \quad (\text{Eq. 1.3})$$

1.4.3. Vanne de spin

C'est en 1991 que le français Bernard Dieny propose une configuration des capteurs GMR dite "vanne de spin" [15]. Cette forme particulière de capteurs est généralement une tricouche composée de deux couches métalliques ferromagnétiques découplées magnétiquement grâce à une couche conductrice mais non magnétique (couche de cuivre) séparatrice (Fig. 1.14A). La première couche, appelée couche dure, a son aimantation bloquée (par interaction d'échange avec une couche antiferromagnétique) dans une direction fixe sur une large gamme de champs magnétiques appliqués, tandis que l'autre couche, appelée couche libre, a une aimantation qui tourne facilement sous l'effet d'un champ magnétique.

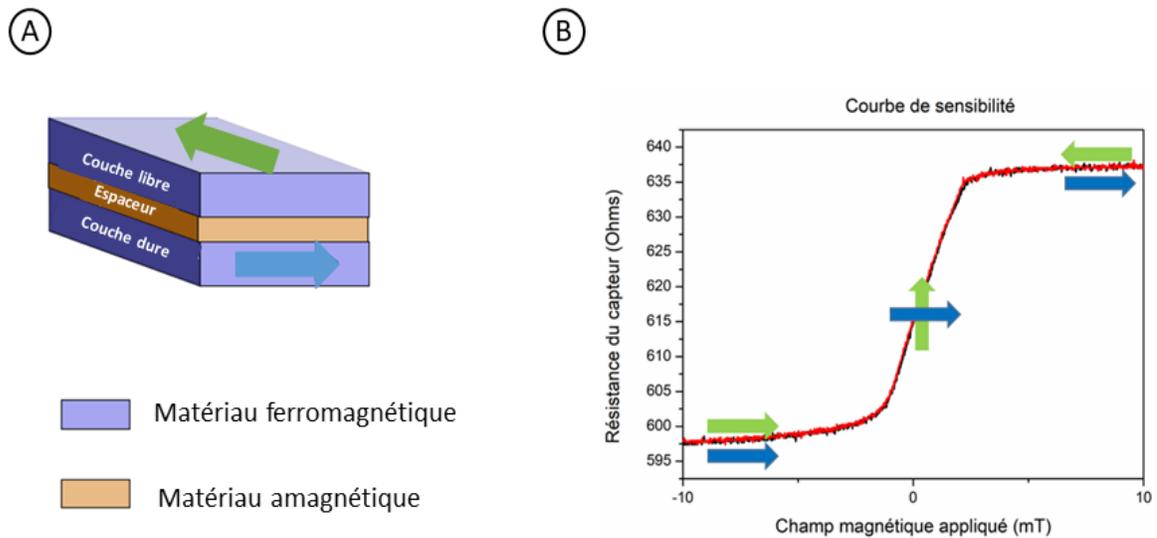


Fig. 1.14 - Principe de la vanne de spin

A: Schéma des principaux composants d'une vanne de spin. Les couches libre et dure sont ferromagnétiques et leur aimantation est représentée par des flèches. L'espaceur est un conducteur non magnétique (du cuivre). B: Courbe de sensibilité de la résistance d'un capteur en fonction du champ magnétique appliqué. Le capteur est saturé dans un état de résistance bas et haut correspondant aux configurations parallèle et antiparallèle des aimantations. Autour du champ nul, une variation linéaire de la résistance en fonction du champ est présente lorsque le capteur est designé correctement. La pente de cette partie linéaire est appelée sensibilité du capteur.

Afin d'obtenir une réponse linéaire en fonction du champ magnétique des capteurs GMR, l'aimantation de la couche dure est fixée perpendiculairement à l'axe de facile aimantation de la couche libre, et cet axe est l'axe sensible du capteur GMR qui est considéré comme la direction y. Cela signifie que de petites variations du champ magnétique externe changeront l'angle entre la couche libre et la couche dure, modifiant ainsi la résistance du capteur et donnant lieu entre deux configurations extrêmes dites saturées (configuration antiparallèle et parallèle des aimantations) possédant respectivement une résistance élevée et faible et pour lesquelles la résistance devient indépendante du champ magnétique appliqué, une zone de variation linéaire de la résistance en fonction du champ magnétique (Fig. 1.14B). C'est dans cette zone que les mesures sont effectuées.

1.4.4. Composition et géométrie des capteurs GMR

Les empilements GMR (Fig. 1.15A) ont été déposés par pulvérisation cathodique et structurés par lithographie UV standard sur des wafers de silicium et de saphir (comme cela sera expliqué au chapitre 2 - pour la double détection, un capot transparent est nécessaire pour aligner les deux substrats).

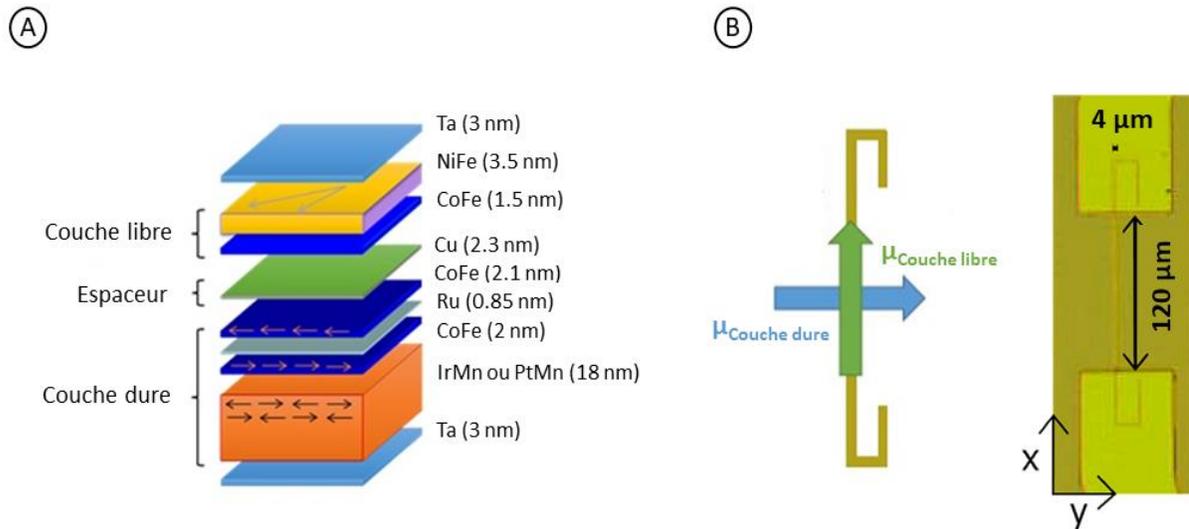


Fig. 1.15 - Composition et géométrie des capteurs GMR

A: Empilement GMR composé de différentes couches d'épaisseur nanométriques [20]. B: Schéma et photographie d'un capteur GMR en forme de yoke allongé. Le capteur mesure 120 µm selon l'axe x et 4 µm selon l'axe y [20].

L'empilement de trois couches magnétiques décrit précédemment pour une vanne de spin est en réalité beaucoup plus complexe. Pour obtenir une couche dure avec une aimantation bloquée indépendante du champ magnétique à détecter et stable à température ambiante, une structure de type antiferromagnétique synthétique bloqué par couplage d'échange avec une couche antiferromagnétique est utilisée [16]. Un antiferromagnétique synthétique consiste en deux couches ferromagnétiques (CoFe) séparées par une couche de ruthénium dont l'épaisseur est choisie afin que les deux couches ferromagnétiques soient couplées antiferromagnétiquement. Ce type de structure a l'avantage de réduire les champs de fuite et donc de diminuer l'impact du champ magnétique mais aussi de réduire les couplages dipolaires sur la couche libre. L'orientation de cette couche dure est réalisée à l'aide d'un recuit sous fort champ magnétique (1 T) à haute température (200°C pour l'IrMn, 300°C pour le PtMn) afin de réorienter le couplage d'échange (paragraphe 2.3.3).

La couche libre, quant à elle, doit être très sensible à de faibles variations de champs magnétiques extérieurs ainsi un faible champ coercitif mais aussi une forte polarisation de spin afin d'augmenter l'effet GMR sont nécessaires. Pour cela, une couche de NiFe (faible coercivité) et une couche de CoFe (forte polarisation de spin) sont couplées et elles suivent l'aimantation du matériau de plus faible coercivité.

Une fine couche de cuivre vient séparer et découpler la couche dure et la couche libre. En effet, le retournement de la couche libre ne doit pas affecter la couche dure. Or cette couche de cuivre ne doit pas être trop épaisse afin d'éviter que les électrons perdent leur polarisation lors de la traversée du stack, sinon l'effet GMR disparaît. Ainsi, l'épaisseur de cette couche doit être inférieure à la longueur de diffusion de spin qui est la longueur moyenne où l'électron conserve la direction de son spin. L'épaisseur choisie est souvent aux alentours de 2 nm.

Lors de ces travaux de thèse, différentes structures d'empilement GMR ont été fabriquées et utilisées. Nous avons utilisé des structures avec des couches antiferromagnétiques en PtMn mais aussi en IrMn. La seule différence entre ces deux structures est que la couche dure est bloquée sur une plus large gamme de température et réagit moins aux décharges électrostatiques qu'avec une couche antiferromagnétique en IrMn.

De plus, la forme des capteurs finaux est également très importante afin de minimiser l'hystérésis et linéariser au maximum la réponse de nos capteurs. En effet, quand on introduit une anisotropie de forme dans le système (longueur et largeur différente), les moments magnétiques de la couche libre vont s'aligner naturellement dans le sens de la longueur dans un même domaine magnétique [17] en éloignant les deux pôles créés (diminution de l'énergie magnétostatique) et donc créer un axe de facile aimantation pour la couche libre. Ainsi, il y aura un retournement cohérent et progressif de la couche libre, induisant une variation linéaire de la résistance avec le champ. Les capteurs GMR utilisés pour ces travaux ont donc été conçus en forme de yoke allongé (Fig. 1.15B) afin de minimiser la présence de domaines magnétiques qui peuvent être responsables de bruit magnétique (paragraphe 1.4.6).

1.4.5. Magnétorésistance et sensibilité des capteurs GMR

Les biopuces GMR fabriquées sont caractérisées afin d'extraire leur performance grâce à l'estimation du ratio de magnétorésistance et de la sensibilité. La variation de la magnétorésistance et de la sensibilité sont définies en fonction de la résistance R_P (lorsque les aimantations de la couche dure et de la couche libre sont parallèles) et R_{AP} (état antiparallèle). Le ratio de magnétorésistance du capteur (% MR) et sa sensibilité S sont calculés en utilisant les équations (Eq. 1.4) et (Eq. 1.5), respectivement :

$$\%MR = \frac{R_{AP} - R_P}{R_0} \text{ avec } R_0 = \frac{R_{AP} + R_P}{2} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

$$S = \frac{\Delta R \times 100}{\Delta H \times R_0} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

Les rapports MR typiques sont de l'ordre de 5 à 10 % tandis que la sensibilité est comprise entre 0,5 et 2 %/mT (Fig. 1.16).

Cette courbe de sensibilité permet donc d'obtenir la conversion des résistances ou tension (les GMR sont composées de métaux qui suivent la loi d'Ohm) mesurées aux bornes du capteur GMR en champ magnétique.

Elle permet également de vérifier la linéarité de la variation en champ de la résistance du capteur et de détecter la présence d'un cycle d'hystérésis ou d'un décalage en champ de la résistance qui peuvent poser problème. Dans le cas de l'hystérésis, un même champ magnétique peut donner lieu à deux valeurs de résistance, rendant ainsi impossible la conversion des résistances en champ à l'aide de la sensibilité. L'offset en champ de la courbe de sensibilité, quant à lui, peut empêcher d'accéder à l'ensemble de la zone linéaire de la sensibilité. Ces deux effets négatifs peuvent avoir lieu lorsque l'orientation de la couche dure n'est pas

strictement perpendiculaire à celle de la couche libre. Cela peut se produire au moment de piéger la couche dure d'un recuit sous fort champ magnétique.

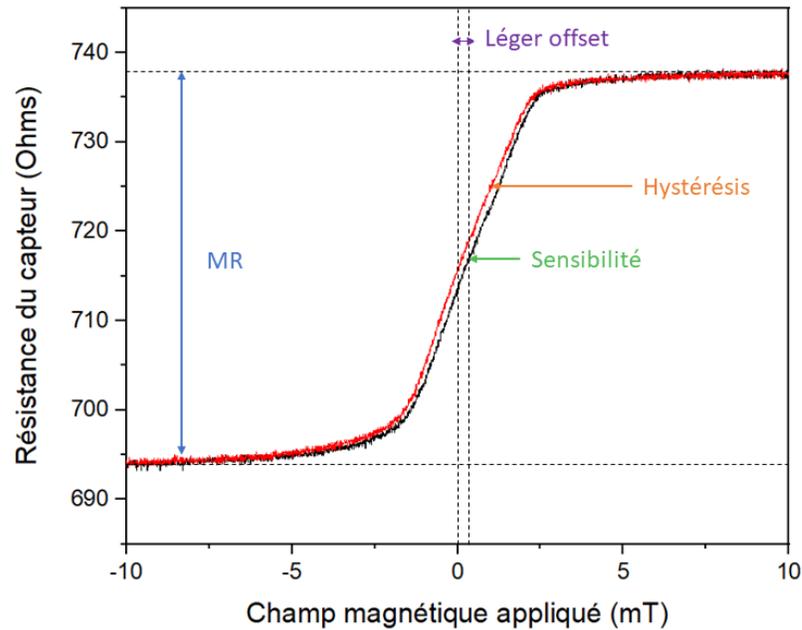


Fig. 1.16 - Courbe de sensibilité détaillée

Grâce à la courbe de sensibilité des capteurs GMR, il est possible d'en extraire plusieurs grandeurs telles que : la magnétorésistance, l'offset, l'hystérésis et la sensibilité.

Un moyen de remédier à l'offset et à l'hystérésis consiste à appliquer un champ bias dans le plan du capteur (xOy). Dans le cas de nos capteurs, par convention la couche libre est dirigée suivant Ox et la couche dure suivant Oy. On appelle H_{bias}^{transv} un champ bias appliqué dans la direction du champ extérieur H_{app} , d'après la Fig. 1.17 on voit qu'il a pour effet de recentrer la courbe de sensibilité en permettant aux couches d'être perpendiculaires. A contrario, un champ bias appliqué suivant Ox, H_{bias}^{long} impose un sens préférentiel de l'aimantation de la couche libre et permet de supprimer l'hystérésis en piégeant la couche libre un peu plus. La gamme de linéarité est augmentée mais la sensibilité est réduite.

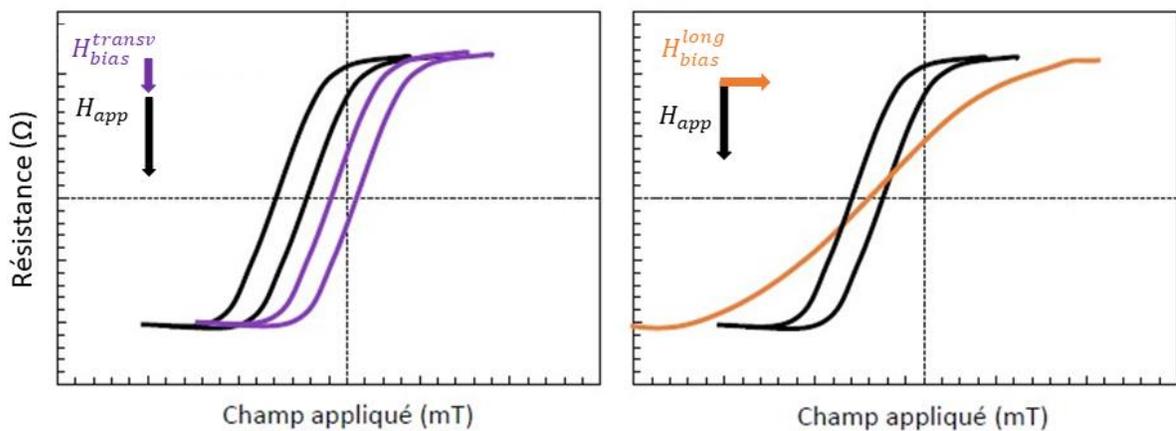


Fig. 1.17 - Schéma de l'application d'un champ biais transverse (à gauche) ou longitudinal (à droite) et effet sur la courbe de sensibilité

Schéma modifié de [20].

Dans le cas de nos expériences, les biopuces sont introduites dans un aimant permanent de 900 G qui permet d'aimanter les billes magnétiques. La principale composante de ce champ magnétique est selon l'axe Oz (axe non sensible des capteurs). Cet aimant est suffisamment homogène pour que des gradients magnétiques n'entraînent pas la création d'agrégation de billes dans le canal mais il possède cependant des faibles champs bias, selon les composantes Ox et Oy (dans le plan du capteur), qui permettent de réduire les effets d'hystérésis et d'offset. Les champs de bias effectifs ont été mesurés à l'aide d'un gaussmètre :

$$H_{bias}^{long} = 20 \text{ G}$$

$$H_{bias}^{transv} = 60 \text{ G}$$

1.4.6. Sources du bruit

Les capteurs sont caractérisés en termes de performances par leur sensibilité mais également par leur niveau de bruit [18] [19] [20]. Le bruit est inévitable dans la physique des capteurs et de l'électronique. Ce bruit peut être interne ou externe au montage expérimental. Il correspond aux fluctuations aléatoires d'une grandeur physique autour de sa valeur moyenne. Il peut être un facteur limitant à l'analyse et l'interprétation des signaux obtenus.

Les trois principaux bruits présents dans le capteur GMR sont :

- Le bruit thermique
- Le bruit en 1/f
- Le bruit télégraphique (Random Telegraphic Noise (RTN))

1.4.6.1. Le bruit thermique

Le bruit thermique, ou bruit blanc, est un bruit indépendant de la fréquence et qui n'est pas d'origine magnétique mais provient directement des fluctuations thermiques des électrons (mouvement brownien) sans l'application de la moindre tension ou d'un courant. Ce bruit peut être réduit par une diminution de la température ou de la résistance du capteur.

Le bruit thermique aux bornes d'une résistance R à la température T s'exprime selon sa tension par l'équation (Eq. 1.6) suivante :

$$V_{th} = \sqrt{4k_B T R} \quad (\text{Eq. 1.6})$$

Où k_B est la constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$).

1.4.6.2. Le bruit en 1/f

Ce bruit est très contraignant dans les performances des capteurs magnétorésistifs car il provient directement des variations de résistance (nombre de porteur ou mobilité) du capteur GMR. Ces variations de résistances peuvent être la conséquence de défauts dans le matériau qui pourraient perturber le parcours des électrons. Ce bruit est inversement proportionnel au volume du capteur et diminue avec le nombre de porteurs de charges N_C et s'exprime par l'équation phénoménologique de Hooge (Eq. 1.7) suivante :

$$S_{1/f} = \frac{\gamma R^2 I^2}{N_c f^\beta} \quad (\text{Eq. 1.7})$$

Où γ est le paramètre de Hooge et β compris entre 0,5 et 1,5.

1.4.6.3. Le bruit télégraphique (RTN)

Dans les capteurs magnétorésistifs, le bruit télégraphique intervient lorsque la couche libre n'est pas monodomaine créant ainsi des fluctuations d'aimantation de la couche libre. Ces domaines magnétiques induisent des sauts de tension entre plusieurs niveaux d'énergie. Le RTN dépend fortement de la température, du courant de polarisation et du champ magnétique extérieur appliqué au capteur. Le RTN s'exprime par des pics lorentziens dans la mesure de la densité spectrale du capteur.

Dans nos expériences, il s'agit du bruit qui nous pose le plus de problème lors de la calibration de la sensibilité à l'intérieur du montage ([paragraphe 3.3.2](#)).

1.4.6.4. Autres bruits

A ces bruits spécifiques aux capteurs magnétorésistifs peuvent s'ajouter d'autres bruits comme le bruit environnemental mais aussi le bruit de la chaîne de mesure et d'acquisition. C'est pourquoi les expériences sont réalisées dans une chambre bas bruit composée d'un empilement de couches mu-métal et d'aluminium afin d'atténuer les basses et hautes fréquences magnétiques et donc de limiter les bruits parasites environnementaux [21]. Le montage expérimental a été choisi afin de réduire la contribution du bruit de l'électronique. Il est détaillé dans le [paragraphe 2.4](#).

1.4.6.5. Mesures de bruit et détectivité

Le bruit d'un capteur GMR est mesuré dans une chambre bas bruit (blindée) afin de diminuer le bruit environnemental comme décrit précédemment. Le capteur est alimenté par une batterie (pour éviter les parasites du secteur et du 50 Hz notamment) et inséré dans un pont de Wheatstone. Une résistance variable permet d'équilibrer le pont pour pouvoir faire des mesures autour de 0 V. Ainsi, ce signal centré autour de 0 V peut être amplifié par un amplificateur bas bruit (INA 103) avec un gain de 500. Puis le signal est une nouvelle fois amplifié par un amplificateur Stanford passe bas avec un gain de 20 et filtré avec une fréquence de coupure à 10 Hz (pour éviter le repliement de fréquence $f_c <$ fréquence d'acquisition) avant d'être envoyé vers la carte d'acquisition.

Cependant dans le cas de nos expériences, un blanc de quelques secondes est réalisé à chaque nouvelle expérience en salle bas bruit afin de déterminer grâce au programme de traitement des données, le bruit expérimental ([paragraphe 2.5.2](#)).

La détectivité est la limite de détection magnétique (LOD) et correspond au champ magnétique induisant un rapport du signal sur bruit (SNR) égal à 1. La détectivité est obtenue en divisant la densité spectrale du bruit par la sensibilité.

Il est possible de mesurer la détectivité en salle bas bruit. Cette fois ci, la biopuce est placée dans une bobine et le capteur GMR est alimenté avec une tension de 1 V (même tension que lors de nos expériences). Il s'agit d'une bobine préalablement calibrée afin de connaître le champ magnétique généré en fonction du courant parcourant la boucle. Sur la courbe de bruit obtenue, un pic de tension à la fréquence du signal est

obtenu. Or le champ magnétique est connu, donc il est possible de retrouver la sensibilité et ensuite de remonter à la détectivité en divisant la courbe obtenue par la sensibilité.

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le **Tableau 1.1** :

Tableau 1.1 - Caractéristiques des capteurs GMR utilisés pour nos expériences

Capteurs GMR	Sensibilité	Bruit thermique	Niveau de bruit moyen (bruit total)	Détectivité	Limite de détection
120 × 4 μm	0,5 - 2 %/mT	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁹ V/√Hz	40 mV	10 ⁻⁸ T/√Hz	290 nT (sensibilité de 0,78 %/mT et 1 kHz)

1.5. Etat de l'art des précédentes biopuces

Actuellement, parmi les tests de diagnostic précoce, rapides et faciles à utiliser, les tests immunochromatographiques (**paragraphe 1.2.2.1**) sont parmi les plus utilisés. La simplicité, la rapidité (résultats en quelques minutes) et la transportabilité sont leurs principaux avantages, mais leur manque de sensibilité est un inconvénient majeur (entre 10⁵ et 10⁶ CFU/ml pour les bactéries, par exemple). D'autres méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie, comme les tests ELISA ou PCR (**paragraphe 1.2.2.2**), ont de meilleures sensibilités (entre 10³ et 10⁴ CFU/ml) mais nécessitent plusieurs heures de travail et un personnel qualifié. Le développement des micro- et nanobiotechnologies au cours des dernières décennies a permis la création de toutes sortes de laboratoires sur puce efficaces et de plus en plus compétitifs dans ce domaine du diagnostic précoce. Dans ce contexte, les capteurs à magnétorésistance géante (GMR), développés et utilisés dans une grande variété d'applications (industrie automobile, informatique, etc.), très sensibles à température ambiante, présentent également un réel potentiel dans le domaine de la santé, en particulier pour le développement de dispositifs de diagnostic précoce au chevet du patient. Le principe de détection de cette technique repose sur l'utilisation de particules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux, dirigés contre la cible d'intérêt. La détection dynamique de cette dernière, après interaction avec les particules magnétiques, est réalisée à l'aide de capteurs GMR, qui permettent de compter un par un les objets biologiques magnétiquement ciblés. En outre, les mesures peuvent être effectuées sur des matrices complexes, même opaques, et des cibles biologiques de nature éventuellement différente (cellules, bactéries, etc.) peuvent être détectées sans étape de lavage préalable et même à faible concentration.

Les premières expériences de détection dynamique d'objets biologiques ont été réalisées à l'aide d'une série de capteurs GMR situés sous un canal microfluidique dans lequel circulent les cibles d'intérêt marquées magnétiquement.

Un objet magnétique de moment μ situé en un point B dans le canal crée un champ dipolaire en un point C d'un capteur GMR dont l'équation est la suivante (**Eq. 1.8**) :

$$\vec{H}_{dip} = 3\vec{BC} \times \frac{\vec{BC} \cdot \vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^5} - \frac{\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^3} \tag{Eq. 1.8}$$

Le champ dipolaire dépend donc du moment magnétique de l'objet détecté et de la distance au cube qui le sépare du capteur.

- Cytomètre à puce magnéto-résistive

L'un des premiers dispositifs portables à détection GMR dynamique a été mis en place par l'équipe de Paulo Freitas [22] [23]. En effet, l'utilisation d'anticorps spécifiques de l'objet biologique d'intérêt (cellules souches hématopoïétiques CD34+) marqués par des particules magnétiques commerciales (Micromod 2 μm fonctionnalisées par un anticorps anti-CD34) permet de détecter et de compter des objets magnétiques un à un avec ce système sous l'application d'un champ magnétique extérieur. Ce type de dispositif est composé d'une puce microfluidique surmontant un capteur GMR. Après incubation des objets biologiques avec les billes magnétiques fonctionnalisées, la solution est injectée dans le canal microfluidique. Les billes magnétiques vont générer un champ dipolaire grâce à l'aimant permanent dans lequel la biopuce est introduite. Ce champ dipolaire pourra ainsi être détecté par les capteurs GMR. Les conditions microfluidiques et magnétiques sont toutes deux adaptées pour travailler avec des objets biologiques.

Ce genre de test a pour avantage d'être rapide, simple d'utilisation, transportable et sans étape de lavage. Cependant, dans ce système, il n'y a aucune possibilité d'obtenir d'information sur la hauteur de passage des objets magnétique en solution (objets biologiques d'intérêt, billes surnuméraires et agrégats de billes) et donc par extrapolation sur leur moment magnétique or comme vu précédemment dans l'équation (Eq. 1.8), il y a une compétition entre μ et z . Le champ dipolaire détecté par le capteur GMR diminue avec la distance au cube de l'objet par rapport au capteur. Ainsi, un agrégat ou une bille circulant au fond du canal, très proche du capteur GMR, peut donner un signal équivalent à celui d'un objet biologique marqué magnétiquement par plusieurs billes mais circulant plus haut, loin du capteur GMR. Il est donc impossible de distinguer les agrégats des objets biologiques.

De plus, les billes magnétiques utilisées par cette équipe sont assez grosses, l'occupation stérique, lors de l'immunocapture des cellules par les billes fonctionnalisées, sera limitée et donc les cellules peut-être moins bien labélisées qu'avec de plus petites billes. Bien que ces billes magnétiques doivent avoir un moment magnétique plus important, les signaux seront sans doute plus faibles car les cellules seront moins bien labélisées.

- Biopuce à un étage GMR

Un second prototype de laboratoire sur puce à base de capteurs magnétiques (Fig. 1.18) composé également d'un capteur GMR placé sous un canal microfluidique en PDMS, a été réalisé par Giraud et al [20] [24] en collaboration avec le LNO et le LERI. Cette biopuce a été testée sur un modèle biologique de cellules de myélome murin (NS1) immunocapturées par des billes magnétiques commerciales (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) de 1 μm de diamètre, fonctionnalisées par des anticorps (anti-CD138) reconnaissant ces cellules. Afin de limiter les faux positifs, liés aux billes et aux agrégats de celles-ci, un espaceur de quelques micromètres a été placé entre le capteur GMR et le canal microfluidique. Ainsi les signaux provenant des billes et des agrégats passant dans le bas du canal ont été en partie supprimés.

Ce prototype a permis d'atteindre une limite de détection de 3×10^4 cellules/mL légèrement inférieure à celle obtenue avec les tests ELISA ou par cytométrie de flux sur ce même modèle biologique [24]. Mais inévitablement, l'ajout de cet espaceur induit une perte de sensibilité du dispositif. En effet, la sensibilité du dispositif est réduite par la distance accrue entre le canal et le capteur GMR. Cette méthode présente donc l'inconvénient de diminuer fortement le champ dipolaire, et donc l'intensité du signal, en raison de la hauteur de l'espaceur. D'autre part, elle ne permet pas de discriminer la nature des objets qui circulent dans le canal et ne permet pas la détection d'entités biologiques plus petites que les cellules eucaryotes. La sensibilité (de

3×10^4 cellules/mL) n'a pu donc être déterminée que par la différence du nombre de signaux détectés entre l'échantillon spécifique positif et les contrôles négatifs [24].

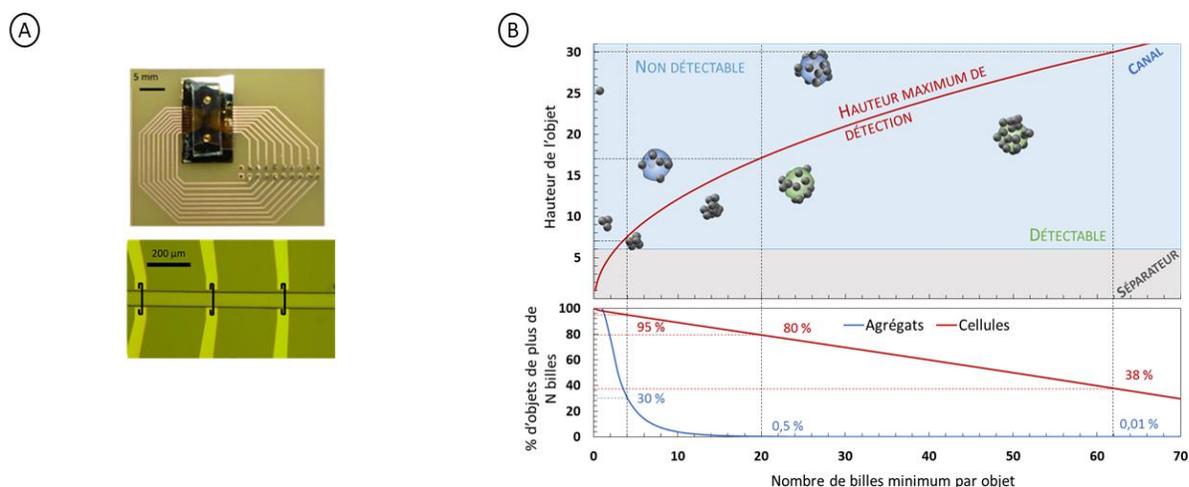


Fig. 1.18 - Principe de la biopuce à un étage GMR

A: Photos de la biopuce à un étage GMR. **B:** Schématisation de la détection de la biopuce à un étage avec l'espaceur entre le canal microfluidique et le capteur GMR. La hauteur de passage de l'objet dans le canal microfluidique y est représentée en fonction du nombre de billes par objet. Les petits agrégats (inférieurs à 4 billes) ne sont jamais détectés et il faut environ 60 billes pour que les objets soient détectés sur toute la hauteur du canal [20] [24].

- Perspectives

Comme le montre l'équation (Eq. 1.8), afin de discriminer les objets biologiques des agrégats, il faut à la fois connaître la hauteur du passage des objets biologiques dans le canal microfluidique ainsi que leur moment magnétique. Par conséquent, pour lever ce verrou, un nouveau prototype de biopuce brevetée (n° 1855217 étendu par voie internationale) [25], a été développé dans lequel un second capteur GMR au-dessus du canal microfluidique est intégré. Ce prototype va donc nous permettre de connaître la nature des objets magnétiques et donc la possibilité de différencier les objets biologiques marqués magnétiquement par de nombreuses billes des agrégats de billes qui provoquent des faux positifs. Le principe de ce dispositif est décrit en détail dans le chapitre 2 -.

1.6. Références

- [1] Féraudet C. Immunothérapie passive des maladies à prions : de l'in vitro à l'in vivo. 2005.
- [2] Production d'anticorps monoclonaux | Le monde en images n.d. <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55907&demande=desc>.
- [3] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495–7. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- [4] Laporte J. Nouveaux anticorps monoclonaux contre les Yersinia pour le diagnostic et l'immunothérapie n.d.:235.
- [5] Kit de dosage ELISA, Protocole, lecteur de microplaques ELISA et laveur de microplaques | Molecular Devices n.d. <https://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>.
- [6] Cytométrie en flux. Wikipédia 2022.

- [7] Cytométrie en flux et Tri cellulaire. BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251 n.d. <http://bfa.univ-paris-diderot.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire/>.
- [8] Fermon C, Pannetier-Lecoeur M, Biziere N, Cousin B. Optimised GMR sensors for low and high frequencies applications. *Sensors and Actuators A: Physical* 2006;129:203–6. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2005.11.043>.
- [9] Geoffroy O. Physique des matériaux magnétiques. Conversion de l'énergie électrique 2006. <https://doi.org/10.51257/a-v1-d2080>.
- [10] Milosevic I. Nanoparticules superparamagnétiques n.d.:19.
- [11] Baibich MN, Broto JM, Fert A, Van Dau FN, Petroff F, Etienne P, et al. Giant Magnetoresistance of (001)Fe/(001)Cr Magnetic Superlattices. *Phys Rev Lett* 1988;61:2472–5. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.61.2472>.
- [12] Binasch G, Grünberg P, Saurenbach F, Zinn W. Enhanced magnetoresistance in layered magnetic structures with antiferromagnetic interlayer exchange. *Phys Rev B* 1989;39:4828–30. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.39.4828>.
- [13] 21- Qu'est-ce que le spin d'une particule ou d'un atome ? - Matière et Révolution n.d. <http://www.matierevolution.fr/spip.php?article923>.
- [14] Fert A. Les débuts de la spintronique - Travaux précurseurs et magnétorésistance géante. *Reflète phys* 2009;5–10. <https://doi.org/10.1051/refdp/2009015>.
- [15] Dieny B. Giant magnetoresistance in spin-valve multilayers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1994;136:335–59. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(94\)00356-4](https://doi.org/10.1016/0304-8853(94)00356-4).
- [16] Grünberg P, Schreiber R, Pang Y, Brodsky MB, Sowers H. Layered Magnetic Structures: Evidence for Antiferromagnetic Coupling of Fe Layers across Cr Interlayers. *Phys Rev Lett* 1986;57:2442–5. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.57.2442>.
- [17] Pannetier-Lecoeur M, Fermon C, de Vismes A, Kerr E, Vieux-Rochaz L. Low noise magnetoresistive sensors for current measurement and compasses. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007;316:e246–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2007.02.105>.
- [18] Moulin J. Microscopie magnétique locale par intégration de nanocapteurs magnétorésistifs n.d.:255.
- [19] Moulin J, Doll A, Paul E, Pannetier-Lecoeur M, Fermon C, Sergeeva-Chollet N, et al. Optimizing magnetoresistive sensor signal-to-noise via pinning field tuning. *Appl Phys Lett* 2019;115:122406. <https://doi.org/10.1063/1.5108604>.
- [20] Giraud M. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante n.d.:170.
- [21] Altarev I, Babcock E, Beck D, Burghoff M, Chesnevskaya S, Chupp T, et al. A magnetically shielded room with ultra low residual field and gradient. *Review of Scientific Instruments* 2014;85:075106. <https://doi.org/10.1063/1.4886146>.
- [22] Loureiro JFQ. UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO n.d.:253.
- [23] Loureiro J, Andrade PZ, Cardoso S, Silva CL da, Cabral JM, Freitas PP. Magnetoresistive chip cytometer. *Lab on a Chip* 2011;11:2255–61. <https://doi.org/10.1039/C0LC00324G>.

[24] Giraud M, Delapierre F-D, Wijkhuisen A, Bonville P, Thévenin M, Cannies G, et al. Evaluation of In-Flow Magnetoresistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool. *Biosensors* 2019;9:105. <https://doi.org/10.3390/bios9030105>.

[25] Deroo M, Giraud M, Delapierre F-D, Bonville P, Jeckelmann M, Solignac A, et al. Proof of concept of a two-stage GMR sensor-based lab-on-a-chip for early diagnostic tests. *Lab on a Chip* 2022;22:2753–65. <https://doi.org/10.1039/d2lc00353h>.

2 - Biopuce GMR à deux étages



Maikane DEROO

2.1. Table des figures & tableaux

Fig. 2.1 - Schéma de la détection d'un objet magnétique traversant le canal microfluidique pour la biopuce à deux étages GMR 67

Fig. 2.2 - Schéma des trois étapes de fabrication des capteurs GMR 69

Fig. 2.3 - Conception de la biopuce et de son canal microfluidique 71

Fig. 2.4 - Photographies des différentes étapes de fabrication de la biopuce GMR 72

Fig. 2.5 - Montage expérimental 73

Fig. 2.6 - A gauche, le nouveau PCB et à droite, le PCB sur son support coulissant imprimé en 3D 74

Fig. 2.7 - Détermination de la sensibilité des capteurs GMR hors du montage 75

Fig. 2.8 - Simulations d'un signal coïncident expérimental avec trois vitesses différentes (10 cm/s, 18 cm/s et 30 cm/s) 76

Fig. 2.9 - Boîtier électronique pour la biopuce GMR à deux étages 76

Fig. 2.10 - Exemple d'un enregistrement de bruit typique 79

Fig. 2.11 - Validation par la forme 80

Fig. 2.12 - Graphiques représentant une coïncidence 81

Fig. 2.13 - Simulations pour la détection d'objets biologiques considérés comme des objets ponctuels 84

Fig. 2.14 - Fonction $f(z_B)$ reliant le rapport des amplitudes totales des signaux haut et bas en coïncidence à la cote z_B 85

Fig. 2.15 - Champ dipolaire produit simultanément sur les capteurs du haut (courbes pleines) et du bas (courbes en pointillées) 86

2.2. Principe de la biopuce GMR à deux étages

Afin de s'affranchir de la détection d'un maximum d'agrégats de billes et d'obtenir un test de diagnostic vraiment compétitif en identifiant la nature des objets détectés, une nouvelle architecture de biopuce plus élaborée a été développée. Elle possède une série de capteurs disposés face à face de part et d'autre (au-dessus et en dessous) du canal microfluidique. Chaque paire de capteurs permet une détection simultanée. En effet, chaque objet magnétique détecté (cibles marquées, agrégats etc.), aimanté par un champ magnétique permanent dirigé suivant Oz, génère un champ dipolaire détecté simultanément sur les deux capteurs alignés face à face. Cette paire de signaux est appelée une coïncidence (Fig. 2.1).

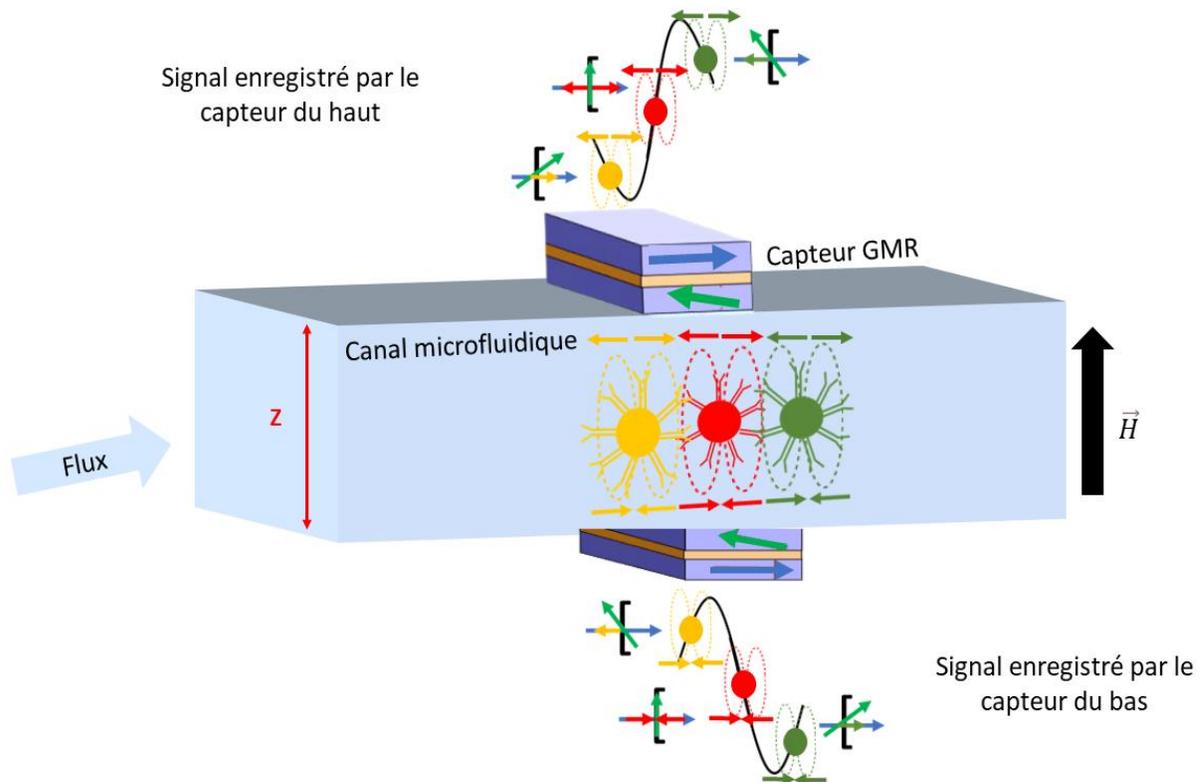


Fig. 2.1 - Schéma de la détection d'un objet magnétique traversant le canal microfluidique pour la biopuce à deux étages GMR

Pour détecter des objets biologiques, qui sont naturellement non magnétiques, il est nécessaire de les marquer magnétiquement au préalable avec des billes magnétiques. Ces dernières sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques qui vont interagir avec les antigènes de la cible d'intérêt (chapitre 3 -).

Comme le montre l'équation (Eq. 1.8), le champ dipolaire émis par un objet magnétique sur un capteur GMR dépend à la fois de son moment μ et de sa hauteur de passage z . Comme nous le verrons de manière plus détaillée dans la suite de ce chapitre, l'analyse des champs dipolaires émis simultanément par cet objet magnétique sur deux capteurs alignés au-dessus et en-dessous du canal microfluidique de hauteur z , permet pour la première fois avec ce type de technique, de déterminer sa hauteur de passage mais également le nombre de billes magnétiques qu'il possède à sa surface et par conséquent son moment magnétique. Il est alors possible de déterminer s'il s'agit d'un agrégat de bille ou d'une cellule marquée magnétiquement : en effet dans la plupart des cas, un agrégat de billes est composé de quelques billes (< 25 billes) alors qu'une cellule est marquée en moyenne par plus de 50 billes. Cette technique permet donc de mieux différencier

les faux positifs des objets biologiques cibles et donc d'augmenter la sensibilité et la spécificité par rapport aux autres tests de diagnostic précoces ou biopuces déjà développées.

Pour cela, plusieurs conditions doivent être respectées. Les capteurs GMR doivent être positionnés face à face pour une bonne synchronisation des signaux. Le canal doit être hermétique, les épaisseurs de résine ou de colle déposées sur les GMR lors de la conception de cette biopuce doivent être connues.

Le signal émis par le capteur GMR lorsqu'il détecte un objet magnétique qui circule dans le canal microfluidique a une forme sinusoïdale bien caractéristique (**Fig. 2.1**). En amont du capteur, la composante détectable du champ dipolaire est d'abord antiparallèle par rapport à la couche dure du capteur ce qui induit une augmentation de la résistance, puis lorsque l'objet est au-dessus du capteur, les composantes s'annulent donc la résistance du capteur est nulle. Enfin lorsque l'objet se déplace un peu plus, la composante du champ dipolaire détectable est cette fois parallèle à la couche dure et la résistance du capteur diminue.

Ainsi lorsqu'un objet magnétique est détecté simultanément par les deux capteurs GMR, leurs signaux sont alors opposés car l'objet magnétique passe entre les deux capteurs. Le capteur haut voit les composantes dipolaires du haut qui sont opposées à celles vues par le capteur du bas. Deux signaux antisymétriques (coïncidence) sont donc détectés, ce qui est un bon facteur de discrimination pour les distinguer des différents pics qui constituent le bruit.

2.3. Fabrication de la nouvelle biopuce

Afin d'obtenir une détection simultanée des objets biologiques circulant dans le canal, il est nécessaire d'aligner précisément les deux ensembles de capteurs GMR. Les couches GMR sur lesquelles sont réalisées les capteurs du bas peuvent être déposées sur n'importe quel substrat ; c'est du silicium qui a été choisi (abondant, standard et peu cher). En revanche, afin de pouvoir aligner parfaitement les capteurs du haut avec ceux du bas, les couches GMR ont été déposées sur un substrat transparent de saphir.

Les premiers tests ont été réalisés sur un substrat en verre, mais les différentes contraintes mécaniques exercées lors de la fabrication ont conduit à des microfissures qui ont endommagé les GMR. Pour cette raison, ils ont été déposés sur du saphir qui présente une meilleure résistance mécanique.

Avoir un substrat transparent pour les capteurs du haut, servant de capot, permet l'utilisation d'une colle optique réticulant sous l'effet des UV pour sceller la biopuce de manière hermétique.

Les biopuces utilisées tout au long de ces trois années sont constituées de 4 capteurs GMR alignés deux à deux de part et d'autre du canal microfluidique (quatre capteurs GMR sur le wafer de silicium et quatre capteurs GMR sur le wafer de saphir) de 4 μm de large et de 120 μm de long (**paragraphe 1.4.4**).

2.3.1. Fabrication des capteurs

Une fois que les couches GMR sont déposées⁶ (**paragraphe 1.4.4**), sur les wafers de silicium et saphir, les capteurs peuvent être fabriqués⁷ (**Fig. 2.2**).

Comme vu précédemment, il est important que les capteurs GMR aient une forme de yoke allongé afin de minimiser l'hystérésis, de linéariser au maximum la réponse des capteurs et de réduire le bruit magnétique. Ainsi pour obtenir cette forme spécifique, l'empilement des couches minces déposées

⁶ Les couches GMR sont déposées par Aurélie Solignac, Myriam Pannetier-Lecoœur ou Claude Fermon par pulvérisation cathodique avec un bâti Rotaris de Singulus

⁷ La majorité des capteurs a été fabriquée par Elodie Fabre-Paul

précédemment est, dans un premier temps, gravé sur les deux wafers [1]. Les wafers sont lavés à l'acétone et à l'isopropanol sous ultrasons puis séchés sous flux d'azote. Ensuite, les wafers sont enduits d'une résine photosensible positive S-1805 étalée à l'aide d'un spin coater (2 s-500 RPM-300 RPM/s, 60 s-4000 RPM-300 RPM/s et 2 s-6000 RPM-1000 RPM/s). Puis, un recuit de 3 minutes à 110°C est réalisé afin d'évaporer les traces de solvants et d'eau ainsi que pour durcir la résine la rendant moins collante lors de la mise en contact avec le masque. La résine est ensuite insolée 10 s à l'aide de l'aligneur MJB4 (Karl Süss, 10 mW/cm², 365 nm) à travers un masque en quartz contenant les motifs des capteurs (yokes) en chrome. Vient ensuite le développement de la résine positive en MF319 pendant 45 s. Seuls les motifs des yokes sont encore recouverts de résine (motifs protégés par le chrome et donc non insolés). Un rinçage à l'eau déionisée et un séchage sous flux d'azote sont effectués puis un nouveau recuit de 3 minutes à 110°C afin d'évaporer les dernières traces de solvants et durcir la résine. Pour terminer cette étape, une gravure ionique d'ions Ar de 10 minutes est réalisée sur les deux wafers afin de retirer la couche GMR des parties sans résine. On retire ensuite la résine qui protège les yokes en trempant les wafers dans de l'acétone sous ultrasons (lift off).

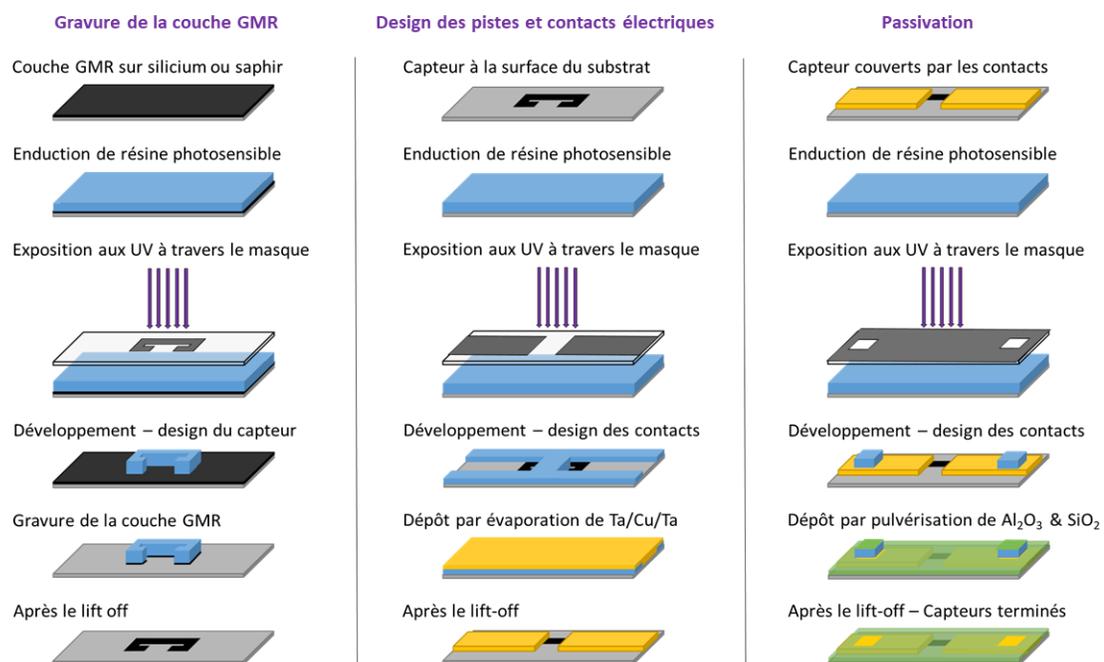


Fig. 2.2 - Schéma des trois étapes de fabrication des capteurs GMR

En commençant par la gravure de la couche GMR afin de réaliser les capteurs en forme de yoke, puis vient le design des pistes et contacts électriques afin de relier la biopuce au boîtier électronique et pouvoir récupérer les signaux des objets magnétiques passant dans le canal microfluidique et pour finir la passivation des pistes pour éviter l'oxydation au cours du temps et protéger le capteur [1].

La deuxième étape consiste en une photolithographie des contacts et des pistes électriques qui permettront de relier les capteurs au reste du dispositif. Les wafers sont une nouvelle fois lavés à l'acétone et à l'isopropanol sous ultrasons puis séchés sous flux d'azote, ils sont ensuite enduits d'une nouvelle résine photosensible positive S-1813 à l'aide d'un spin coater (2 s-500 RPM-300 RPM/s, 60 s-4000 RPM-300 RPM/s et 2 s-6000 RPM-1000 RPM/s). Un recuit de 3 minutes à 110°C est réalisé suivi d'une exposition de 15 s à la MJB4 à travers un masque en chrome contenant les motifs en quartz des contacts. Vient ensuite le développement de la résine positive en MF319 pendant 45 s, un rinçage à l'eau déionisée et un séchage sous flux d'azote. Seuls les motifs des contacts et pistes électriques ne sont plus recouverts de résine (motifs non protégés par le chrome et donc insolés). On refait un recuit de 3 minutes à 110°C et pour finir on dépose,

par pulvérisation cathodique, 10 nm de tantale, 150 nm de cuivre puis 10 nm de tantale. On retire ensuite la résine restante sur les wafers par lift off.

La troisième et dernière étape permet de protéger les pistes électriques et les yokes d'une éventuelle oxydation. On protège les contacts avec la résine positive photosensible S-1813 puis 140 nm d' Al_2O_3 et 110 nm de SiO_2 sont déposés par pulvérisation cathodique. Toute la résine est retirée par lift off.

2.3.2. Découpe des wafers

Pour chaque wafer de silicium et de saphir, deux séries de capteurs sont obtenues, ils sont ensuite séparés à l'aide d'une scie diamant⁸.

2.3.3. Recuit des capteurs

Après la découpe, les quatre capteurs issus d'un wafer de silicium et d'un wafer de saphir sont placés tête bêche dans un four (Futech) sous un champ de 1 T à 200°C pendant 1 h (la durée totale du recuit est d'environ 6 heures)⁹. Cela permet d'orienter la couche dure perpendiculairement à la couche libre et aux couches dures des deux substrats d'être dans la même direction et de minimiser une éventuelle erreur d'orientation de la couche dure. Ils sont disposés l'un à côté de l'autre exactement dans la même position que lorsque la biopuce est scellée (tête bêche) en salle blanche (**paragraphe 2.3.4**). Le wafer de silicium avec les capteurs GMR au-dessus (face avant du wafer) et le wafer de saphir avec les capteurs GMR en dessous (face arrière du wafer).

2.3.4. Conception du canal microfluidique

Une des opérations les plus délicates en microfluidique est la fermeture hermétique de la biopuce sans l'obstruer. Une technologie innovante consistant à dessiner uniquement le squelette du canal à la surface du substrat de silicium par photolithographie est proposée, limitant ainsi les questions de planéité et de propreté à une zone réduite (**Fig. 2.3A**).

Avant de commencer l'assemblage de la biopuce, le substrat du haut (en saphir) a été perforé à l'aide d'un laser (EXCIMER) à l'emplacement des futurs réservoirs du canal microfluidique pour les connexions fluidiques.

Sur le substrat de silicium (substrat du bas), une fine couche de résine SU-8 2002 (MicroChem®) (**annexe A - 7.1**) d'une épaisseur d'environ 2 μm est appliquée sur la couche de passivation des capteurs après un traitement au plasma O_2 (30 s, 200 W, 0,2 mbar) afin d'améliorer l'adhésion. Les contacts électriques des capteurs sont protégés par du ruban adhésif pendant cette étape. Un recuit d'une minute à 65°C et de 5 minutes à 95°C est réalisé puis le wafer est exposé pendant 40 s à l'aide de l'aligneur MJB3 (Karl Süss, 5 mW/cm², 405 nm) suivi d'un nouveau recuit d'une minute à 65°C, 5 minutes à 95°C et 3 minutes à 110°C. L'épaisseur de la couche d'accroche est ensuite mesurée avec un profilomètre mécanique (Alpha-Step, KLA Tencor).

Afin de fabriquer le squelette du canal sur la couche en SU-8 2002, de la résine SU-8 2025 (MicroChem®) (**annexe B - 7.2**) est appliquée à la tournette (**Fig. 2.3B**). Les paramètres du spin coating dépendent de la hauteur de canal souhaitée. Typiquement, pour une hauteur de canal entre 20 et 25 μm

⁸ La plupart des découpes ont été effectuées par Sébastien Delprat

⁹ Les recuits sont effectués par Aurélie Salignac ou Myriam Pannetier-Lecoeur

(nécessaire pour l'étude des cellules eucaryotes), les paramètres sont les suivants : 5 s-500 RPM-300 RPM/s, 30 s-3500 RPM-300 RPM/s, 5 s-6000 RPM-1000 RPM/s. Après un recuit à 65°C pendant 1 minute suivi d'une rampe de température de 2,5°C/mn jusqu'à 95°C pour avoir un dépôt homogène sur toute la surface, le dessin des parois du canal est exposé par photolithographie UV pendant 28 s en utilisant un masque de chrome bien centré au-dessus des capteurs GMR. Après un recuit post-exposition d'une minute à 65°C et 5 minutes à 95°C, la résine SU-8 2025 est développée à l'aide du révélateur SU-8 (MicroChem®) pendant 4 minutes, puis rincée dans de l'isopropanol et de l'eau [2] [3]. La hauteur et la largeur entre les parois du canal sont mesurées avec le profilomètre. Enfin, le substrat de silicium où le canal a été photolithographié est recuit pendant 10 min à 110°C afin que les motifs durcissent et résistent aux solvants. L'étape suivante, la plus délicate, consiste à sceller la biopuce en collant les deux substrats. La colle photosensible Norland Optical Adhesive 81 (NOA81) (annexe C - 7.3) [4] est appliquée à la tournette sur le substrat de saphir (80 s-5500 RPM-300 RPM/s, 3 s-8000 RPM-1000 RPM/s) après un traitement au plasma O₂ (30 s, 200 W, 0,2 mbar). Les contacts électriques des capteurs sont protégés par du ruban adhésif pendant cette étape. Typiquement, une couche de 5 µm d'épaisseur de NOA81 est déposée avec ces paramètres.

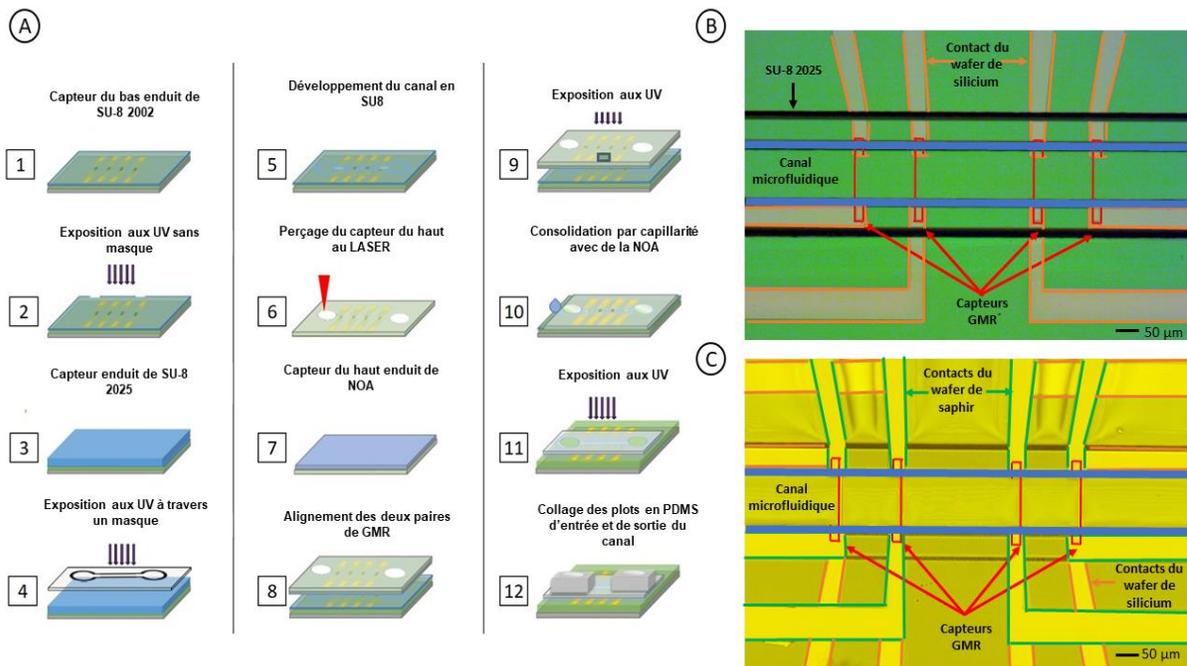


Fig. 2.3 - Conception de la biopuce et de son canal microfluidique

A : Protocole de fabrication de la biopuce [1]. B : Canal microfluidique en SU-8 2025 sur substrat de silicium avant assemblage de la biopuce. C: Canal microfluidique après assemblage de la biopuce.

Les deux ensembles de capteurs haut et bas sont alignés à l'aide de l'aligneur MJB3, le substrat de saphir est mis en contact avec le squelette du canal, sur le substrat de silicium (Fig. 2.3C). La colle NOA diffuse lentement le long des parois du canal. En cas de problème lors de cette étape, la NOA peut être facilement éliminée par un bain d'une minute dans l'acétone. Lorsqu'elle a recouvert l'ensemble du squelette, une exposition de 300 s avec l'aligneur MJB3 est réalisée pour solidifier la colle. Pour permettre la réticulation de la colle NOA masquée sous les contacts opaques du substrat du haut, une exposition de 2 minutes de chaque côté du dispositif à l'aide d'une fibre optique UV flexible est réalisée. Enfin, de la NOA supplémentaire est diffusée par capillarité dans l'espace entre les deux substrats puis exposée 500 s avec l'aligneur MJB3 pour réaliser le scellement.

Concernant les entrées et sorties du canal microfluidique, une couche d'une centaine de nanomètres de SiO₂ est tout d'abord déposée sur la face arrière du substrat de saphir par pulvérisation cathodique. Ensuite, une couche de quelques micromètres de PDMS [5] [6] [7] [8] liquide est déposée à la tournette sur un substrat. Des plots de PDMS réticulés sont découpés et perforés puis ils sont trempés dans le PDMS liquide afin de les coller au niveau des trous d'entrée et de sortie du canal microfluidique. La biopuce est ensuite mise au four à 80°C pour une durée de 2 heures.

Des photographies des différentes étapes de fabrication de la biopuce sont illustrées à la **Fig. 2.4**.

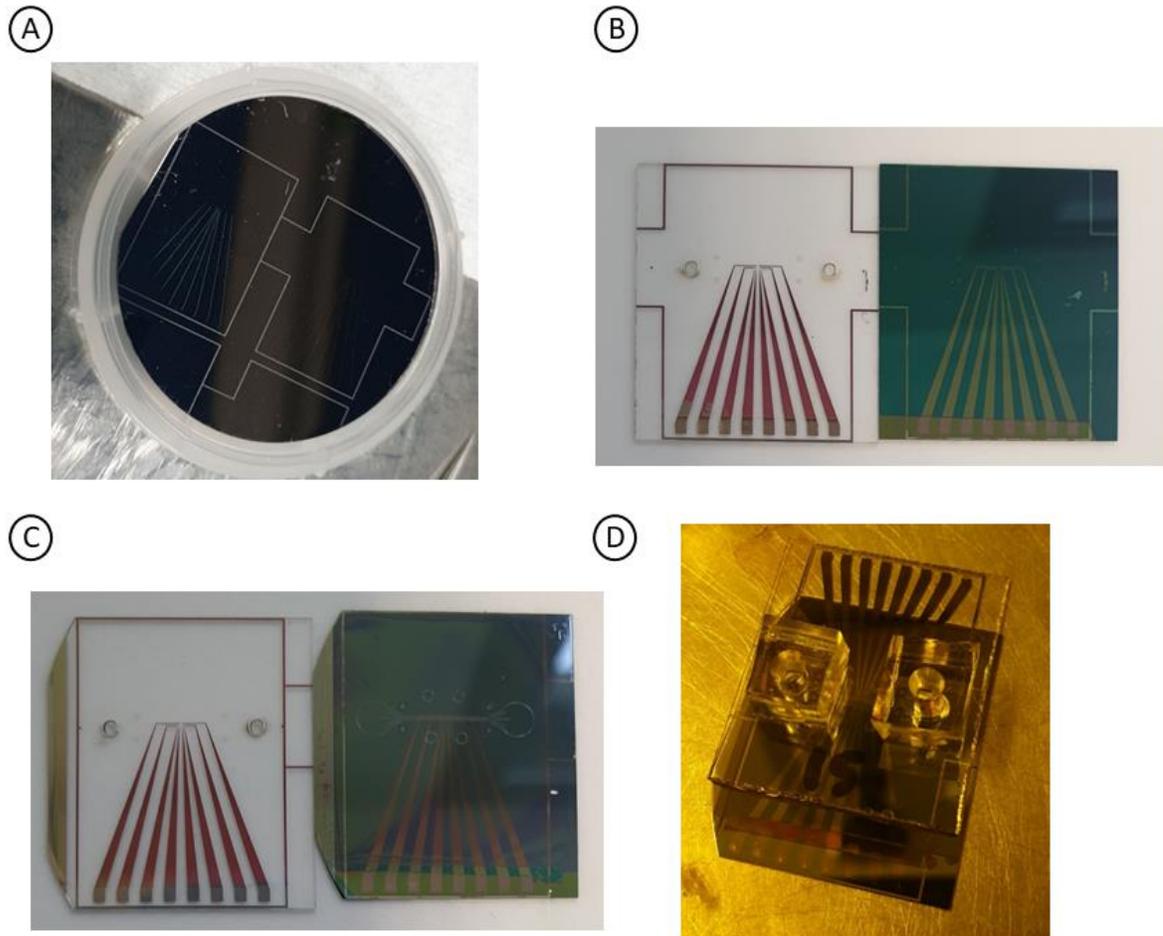


Fig. 2.4 - Photographies des différentes étapes de fabrication de la biopuce GMR

A: Fabrication des capteurs - B: Découpe et recuit des capteurs - C: Dépôt d'une couche d'accroche en SU-8 2002 et conception du canal microfluidique D: Biopuce assemblée.

2.4. Montage expérimental

Comme énoncé précédemment, l'expérience consiste en une détection dynamique simultanée des objets magnétiques circulant dans le canal microfluidique (objets biologiques labélisés par des billes magnétiques, particule magnétique unique ou agrégats de billes magnétiques) par deux ensembles de capteurs placés de part et d'autre du canal microfluidique, donnant lieu pour chaque capteur à un signal symétrique caractéristique [9]. L'ensemble des échantillons est étudié grâce au nouveau dispositif de détection (**Fig. 2.5**).

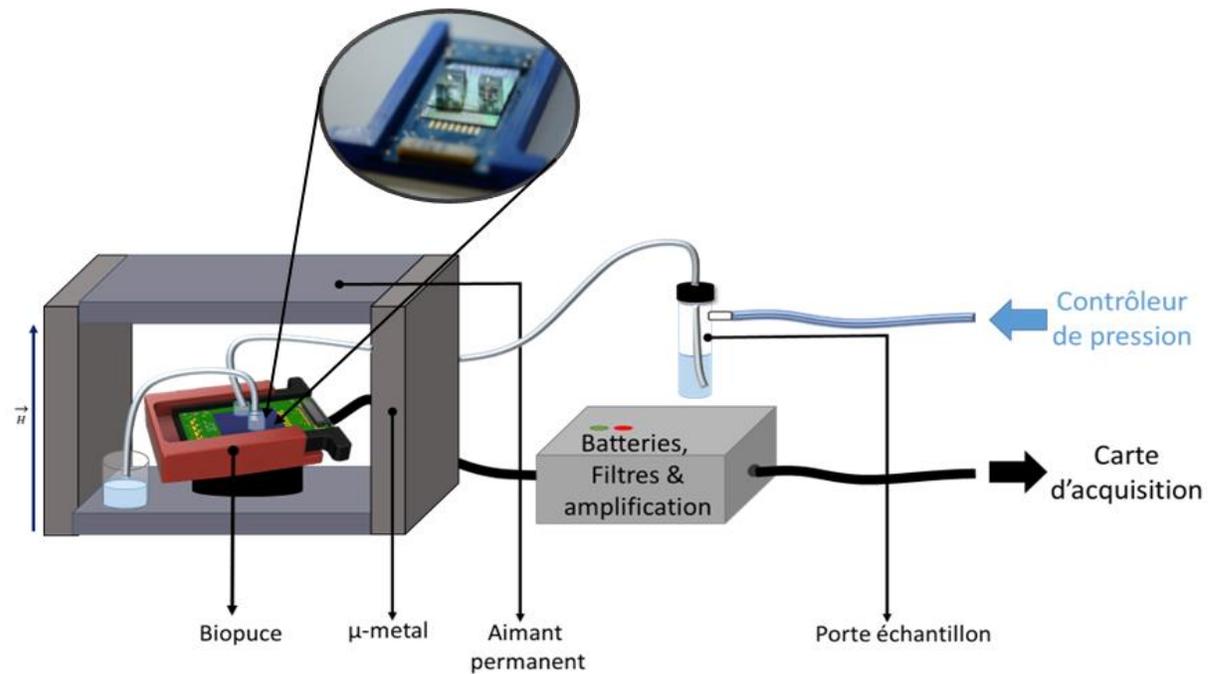


Fig. 2.5 - Montage expérimental

Il comprend la nouvelle biopuce introduite dans un aimant permanent homogène. Les échantillons circulent dans le canal microfluidique grâce à un contrôleur de pression. Les signaux qu'ils émettent simultanément sur les capteurs GMR sont détectés et amplifiés grâce à un boîtier électronique.

Il comprend la nouvelle biopuce introduite dans un aimant permanent homogène afin que le champ magnétique suivant l'axe z oriente l'aimantation des billes qui marquent les objets biologiques. Les capteurs GMR vont alors détecter la composante tangentielle du champ dipolaire induit par l'aimantation de ces billes. Les échantillons circulent dans le canal microfluidique selon l'axe y à une vitesse d'environ 20 cm/s grâce à un contrôleur de pression. Les signaux (de l'ordre de quelques μV) qu'ils émettent simultanément sur les capteurs disposés de part et d'autre du canal sont détectés et amplifiés grâce à un boîtier électronique conçu le plus compact possible, pour rendre le dispositif transportable. Ils sont ensuite analysés par un programme Python « maison » qui permet de calculer le champ dipolaire qui leur est associé. Il est alors possible de déterminer le moment magnétique et la hauteur de passage de chaque objet magnétique détecté.

2.4.1. Montage de la biopuce sur le PCB

Une fois la biopuce fabriquée, elle est montée sur un PCB qui la relie au boîtier électronique par un connecteur de câble flexible (FCC)¹⁰. Ce PCB sert également de support à la biopuce et de protection vis-à-vis des contraintes extérieures. La puce est montée sur celui-ci avec de la résine et les connexions électriques sont réalisées par microsoudure de fils d'or de 50 μm sur les plots de contacts.

Le PCB initial [1] [10] que Manon Giraud a utilisé pour les premières expériences était constitué de deux PCB séparés par des lames de verre. Il était assez complexe d'y coller la biopuce. En effet, il fallait estimer la bonne hauteur des lames de verre et les fixer sur le premier PCB. Ensuite, la puce était positionnée et collée avec de la résine au premier PCB puis le second PCB été ajouté. Les signaux étaient ensuite extraits

¹⁰ Ce PCB a été confectionné par Mathieu Jeckelmann, Mathieu Thévenin et Frédéric Coneggo

par deux connecteurs rectangulaires. De fortes contraintes mécaniques s'appliquaient à la biopuce lors de la mise en place sur ce PCB, provoquant la détérioration voire la rupture de certaines biopuces.

C'est pourquoi, un nouveau PCB a été développé [11], sur lequel la biopuce est collée uniquement sur une face et sans aucune contrainte mécanique pouvant l'endommager ou la casser. Un boîtier imprimé en 3D avec un mécanisme coulissant a été conçu. Les connecteurs rectangulaires ont été remplacés par un connecteur de câble flexible (FCC). Ce nouveau PCB possède des contacts sur les faces supérieures et inférieures qui sont ensuite microsoudés afin de relier électriquement la biopuce au PCB comme illustré par la Fig. 2.6.



Fig. 2.6 - A gauche, le nouveau PCB et à droite, le PCB sur son support coulissant imprimé en 3D

2.4.2. Détermination de la sensibilité des capteurs GMR hors du montage expérimental

Afin de mesurer la réponse du capteur dans un champ magnétique variable, la sensibilité S des capteurs GMR est initialement déterminée en dehors du montage expérimental grâce à un dispositif prévu à cet effet. Les capteurs sont alimentés par un courant de 1 mA fourni par une source de courant Keithley (série 6221) et insérés dans un champ magnétique externe de ± 10 mT le long de l'axe y , généré par deux bobines de Helmholtz de cinq centimètres de diamètre alimentées par un générateur de courant commercial (Kepco). La tension de sortie est filtrée à 30 Hz et amplifiée deux fois par un préamplificateur commercial passe-bas (SR560, Stanford Research Systems). La variation de la magnétorésistance et la sensibilité sont définies en fonction de la résistance R_P (lorsque les aimantations de la couche dure et de la couche libre sont parallèles) et R_{AP} (état antiparallèle) (paragraphe 1.4.5). Pour chaque expérience, on mesure systématiquement les sensibilités des paires de capteurs disposés face à face de part et d'autre du canal microfluidique.

Comme expliqué dans le paragraphe 2.3.3, les capteurs sont disposés au-dessus et en dessous du canal de manière à avoir leur couche dure dans le même sens. Ainsi, lorsqu'on mesure leur sensibilité, leurs couches libres s'orientent de manière identique par rapport à la couche dure sous l'effet du champ magnétique appliqué et sont donc dans le même sens. Par contre le sens de la sensibilité dépend du sens relatif de la couche dure par rapport à la couche libre (Fig. 2.7).

En cas d'erreur de sens lors de la disposition des wafers au moment de l'orientation de la couche dure, les sensibilités sont de sens opposés. Par la suite dans le traitement des données, cette éventualité est considérée et il suffit de multiplier par -1 les signaux d'un des capteurs.

La sensibilité issue de chaque capteur GMR est comprise entre 0,5 et 2 %/mT.

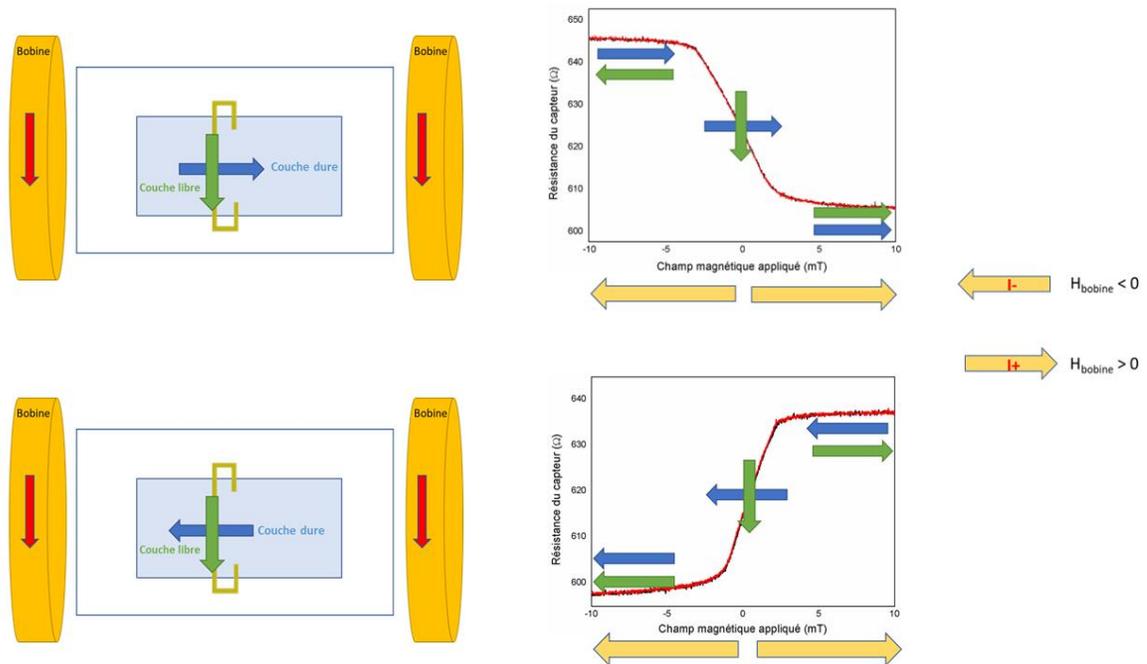


Fig. 2.7 - Détermination de la sensibilité des capteurs GMR hors du montage

La sensibilité dépend de l'orientation de la couche dure des capteurs GMR. Elle est dans le même sens pour tous les capteurs car leur couche dure est dans le même sens afin de minimiser une éventuelle erreur d'orientation de celle-ci (en dehors du montage expérimental).

2.4.3. Aimant permanent

La biopuce collée au PCB est fixée sur un porte-échantillon qui est inséré dans le champ d'un aimant permanent homogène [12] de 90 mT orienté selon Oz perpendiculairement aux couches des capteurs situées dans le plan (xy) et permettant de polariser les billes magnétiques. Cette intensité de champ permet d'aimanter correctement les billes superparamagnétiques en obtenant une valeur proche de leur moment de saturation sans affecter l'aimantation des couches du capteur.

Afin de compenser l'hystérésis et pour éviter de trop réduire la sensibilité des capteurs GMR, la biopuce est vissée sur un support (pour éviter que les capteurs vibrent et créent des parasites) à l'intérieur de l'aimant sur un montage mécanique au niveau de la zone d'homogénéité de l'aimant (hauteur fixe). Ensuite, à l'aide de trois vis micrométriques placées sur ce porte-échantillon, la position (x, y, z) de la biopuce (planarité) est déterminée afin d'obtenir la tension de sortie optimale d'amplitude crête à crête V_{pp} correspondant à la sensibilité la plus élevée possible sur les deux capteurs GMR face à face (paragraphe 3.3.2).

2.4.4. Fluidique

L'échantillon de 200 μ L (ou 1 mL) est stocké dans un réservoir fermé à l'extérieur de l'aimant dans un Eppendorf, relié à l'entrée du canal par des tubulures microfluidiques, et injecté dans le laboratoire sur puce à l'aide d'un contrôleur de pression Fluigent® dont la pression est fixée à 345 mbar. La vitesse d'écoulement de l'objet dans le canal microfluidique (entre 10 et 30 cm/s) est déterminée pour chaque expérience au moyen du programme d'analyse, qui permet d'ajuster la vitesse d'écoulement des signaux expérimentaux obtenus

en fonction des signaux simulés (Fig. 2.8). Cette possibilité d'ajuster ce paramètre est essentielle pour les études futures d'objets biologiques dans différentes matrices complexes qui peuvent être plus visqueuses que le milieu de culture (sang, plasma, etc.). Même si les capteurs ne sont pas correctement alignés deux à deux, les signaux peuvent alors montrer un décalage temporel entre eux, par exemple proportionnel à la vitesse de déplacement de l'objet magnétique dans le canal microfluidique.

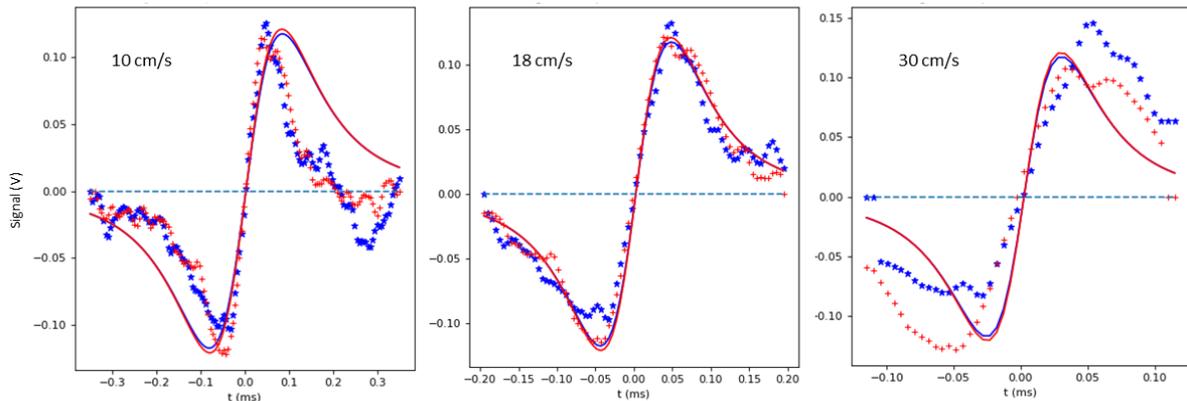


Fig. 2.8 - Simulations d'un signal coïncident expérimental avec trois vitesses différentes (10 cm/s, 18 cm/s et 30 cm/s)

La vitesse de 18 cm/s permet de reproduire correctement le signal expérimental. Les lignes pleines représentent les fits des signaux mesurés qui sont représentés par des points.

2.4.5. Electronique

L'électronique initiale utilisée pour filtrer et amplifier le signal montrait un comportement incohérent puisque le bruit blanc variait selon les expériences et toute vibration extérieure provoquait des pics de bruit. De plus, elle regroupait plusieurs boîtiers. Or ce test de diagnostic doit être transportable facilement dans diverses infrastructures, il a donc été décidé de concevoir un nouveau boîtier électronique.

Initialement, l'électronique regroupait trois boîtiers. Le premier boîtier contenait une batterie externe pour l'alimentation électrique, générant $\pm 11,1$ V. Le deuxième boîtier, le frontal analogique pour filtrer et amplifier le signal. Et enfin, le dernier boîtier était utilisé pour transmettre le signal du capteur d'un connecteur de câble flexible (FCC) à un connecteur BNC.

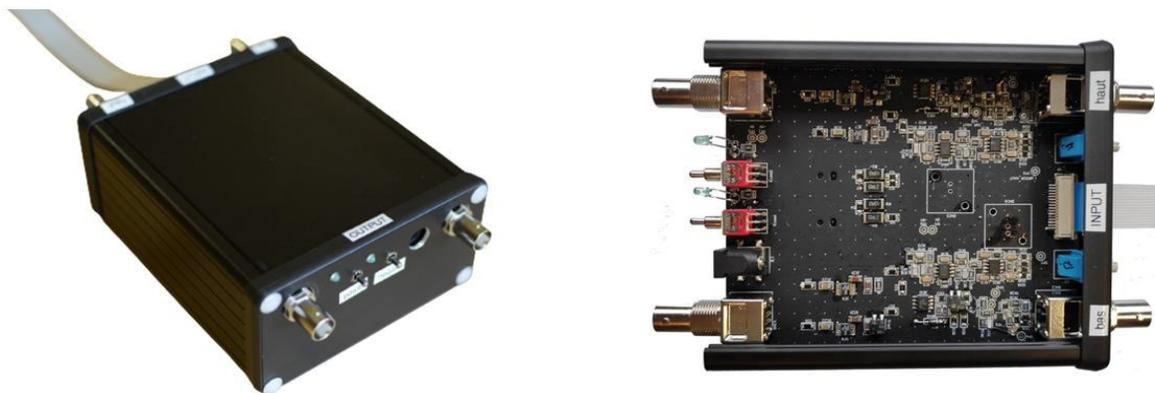


Fig. 2.9 - Boîtier électronique pour la biopuce GMR à deux étages

Cette électronique est composée d'un unique boîtier contrairement aux expériences précédentes [1] [10] où l'électronique était composée de trois boîtiers différents.

L'électronique actuelle¹¹ est composée d'un unique boîtier (Fig. 2.9). Comme deux capteurs sont utilisés en même temps de chaque côté du canal microfluidique, un frontal d'acquisition à deux canaux a été conçu et développé.

Fondamentalement, un capteur GMR étant essentiellement une résistance variable, pour mesurer son signal, le capteur est polarisé avec un courant constant et la différence de tension induite par la variation de la résistance est mesurée. La polarisation des capteurs peut être réalisée par un pont de Wheatstone [13] équilibré et régulé par un régulateur de tension. On peut alimenter les capteurs d'une autre façon : par une source de courant qui aurait l'avantage de supprimer les résistances supplémentaires et de diminuer le bruit. Deux alternatives au pont de Wheatstone ont donc été testées : une source de courant ordinaire et un miroir de courant.

Le pont de Wheatstone est la méthode la plus avancée car ses performances ne dépendent pas d'un élément actif et elle permet une amplification différentielle. Néanmoins, cette méthode ne permet pas une régulation du courant indépendante du capteur. Même si un miroir de courant ou une source de courant génère un bruit plus faible que le pont de Wheatstone, un miroir de courant repose entièrement sur les performances d'un élément actif et si cet élément ajoute du bruit ou que le courant est mal reflété il y aura une perte de SNR ; quant à la source de courant ordinaire, elle ne permet pas une amplification différentielle ce qui la rend très sensible aux variations de température.

La méthode utilisée, et celle utilisée dans l'électronique précédente, est celle d'un pont de Wheatstone régulé par un régulateur de tension LT3045 afin de polariser le capteur et d'éliminer le bruit de polarisation par le biais du rapport de réjection en mode commun de l'amplificateur différentiel. Lorsque 1 mA traverse le capteur, on observe une variation de 2×10^{-4} V à 8×10^{-4} V de la différence de potentiel aux bornes du capteur GMR.

Par conséquent, comme le numériseur a une plage de tension d'entrée de 10 V, un gain de 80 dB (10 000 V/V) est nécessaire. Ainsi, un premier étage constitué d'un amplificateur différentiel AD8421 (Texas Instruments) à faible bruit (1,12 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ pour un gain de 60 dB) avec un gain de 60 dB (500 V/V) a été mis en place. Il offre également un bon rapport de réjection en mode commun (80 dB) et met en œuvre un filtre passe-haut de premier ordre $F_c = 150$ Hz.

Un deuxième étage qui comprend deux filtres passe-bas actifs de type Sallen-key (10 dB chacun) constitués d'amplificateurs opérationnels de précision AD8676 (Analog Devices) est mis en place pour obtenir le gain de 20 dB nécessaire pour atteindre un gain global de 8600 V/V.

Pour garantir un niveau de bruit minimal, deux batteries lithium-ion alimentent l'ensemble du système, ce qui assure plus de 48 heures de mesures continues.

L'ensemble du système forme un filtre passe-bande actif (150 Hz - 37 kHz) afin de sélectionner spécifiquement la gamme de fréquences correspondant aux déplacements des cellules.

De plus, un PCB à quatre couches a été choisi, les pistes de signal sont placées sur les couches 1 et 4 et entourées d'un plan de masse tandis qu'un plan d'alimentation positif occupe la deuxième couche et un plan d'alimentation négatif occupe la troisième couche. Avec cette superposition, le bruit entre les pistes de signal est minimisé car chaque piste est entourée par le plan de masse [14].

¹¹ Le nouveau boîtier électronique a été designé par Mathieu Jeckelmann, Mathieu Thévenin et Frédéric Coneggo

2.5. Traitement des données

Afin d'analyser les données obtenues avec cette nouvelle biopuce, un programme Python¹² a été développé et breveté (n° FR2206315 déposé le 24 juin 2022). Plusieurs étapes sont nécessaires avant de déterminer le moment magnétique de chaque objet et donc de mieux discriminer les cellules labélisées des agrégats de billes.

Ce programme est écrit en Python 3.8. Il lit les données d'un couple de capteurs GMR haut et bas qu'on choisit au préalable. Il recherche tout d'abord selon certaines spécifications, que nous détaillons ci-dessous, les pics émergeant du bruit, puis les « signaux valides » composés, par convention, d'un pic négatif précédant un pic positif, qui correspondent au champ dipolaire des objets magnétiques émis au niveau des capteurs. Il recherche ensuite les coïncidences¹³ temporelles entre signaux valides des capteurs haut et bas, et pour chaque coïncidence calcule la hauteur de passage z_B de l'objet marqué magnétiquement dans le canal microfluidique à l'aide du rapport des amplitudes des signaux haut et bas. Le nombre de billes magnétiques N_b portées par l'objet est alors déduit, et les histogrammes correspondant (z_B et N_b) tracés après élimination des coïncidences dites non valides où les tests du χ^2 (haut et bas) entre signal mesuré et calculé sont négatifs ($\chi^2 > \chi^2 \text{ max}$).

2.5.1. Structure des données

Tout d'abord, les fichiers BIN sont ouverts et les signaux sont reconstruits. Il y a un fichier BIN pour tous les canaux et les échantillons sont stockés avec une alternance capteur haut et capteur bas. Les données ont été codées en tant qu'entier non signé sur 2 octets (16 bits). Le nombre de canaux d'échantillonnage est typiquement de plusieurs dizaines de millions, et un canal d'échantillonnage correspond à un intervalle de 5 μs . Les données sont ramenées dans l'intervalle [-5 V : 5 V], puis, suivant le sens de branchement de chaque capteur dans l'expérience considérée, multipliées par 1 ou -1 de manière à ce que chaque signal valide d'un capteur consiste en un pic négatif suivi d'un pic positif.

2.5.2. Détermination du bruit de chaque capteur

Pour chaque échantillon, une dizaine de secondes d'acquisition de données est réalisée sans flux afin de caractériser le bruit. Cet intervalle est spécifié manuellement (les 1 600 000 premiers canaux) et les valeurs minimum et maximum du bruit sont calculées pour les deux capteurs. L'écart-type σ de la valeur absolue du bruit est d'abord calculé pour chaque capteur, puis le niveau de bruit égal à 2σ est déterminé (Fig. 2.10).

¹² Ce programme a été développé en collaboration avec Pierre Bonville

¹³ Pour rappel, une coïncidence correspond aux signaux émis simultanément par une paire de capteurs haut et bas alignés lorsqu'ils détectent le même objet magnétique

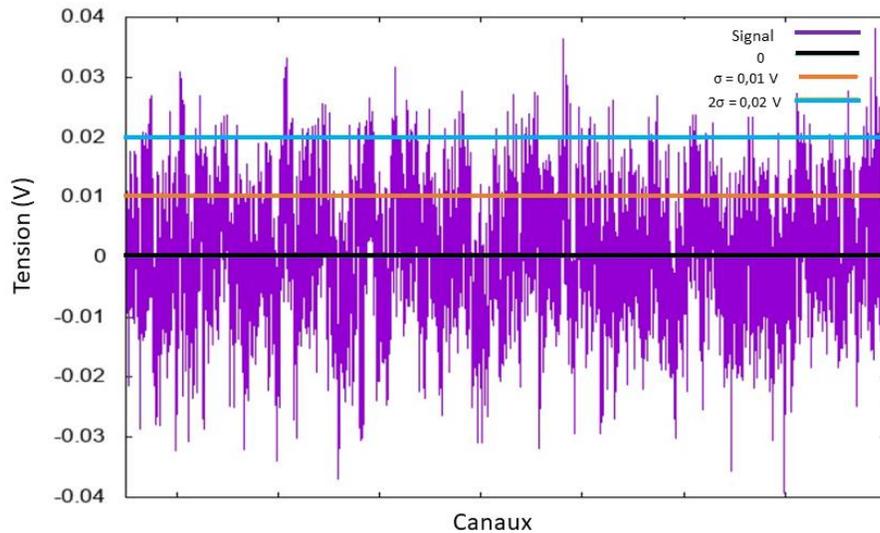


Fig. 2.10 - Exemple d'un enregistrement de bruit typique

Son écart-type σ vaut 0.01 V (ligne orange) et le niveau de bruit 2σ vaut 0.02 V (ligne bleu).

2.5.3. Détection des pics

Après cette étape, tous les pics positifs et négatifs qui forment le signal magnétique caractéristique mais qui peuvent provenir aussi du bruit, sont détectés à l'aide de la fonction « find_peaks » de Python. Cette fonction va trouver tous les maxima locaux en comparant simplement les valeurs voisines. Pour satisfaire cette fonction et réduire le nombre de pics détectés, il est nécessaire d'utiliser plusieurs paramètres tels que :

- La hauteur minimale des pics en valeur absolue fixée à une fois (modifiable) la valeur du bruit déterminée précédemment pour chaque capteur.
- La proéminence du pic par rapport à la ligne de base. C'est-à-dire la quantité dont un pic se détache de la ligne de base environnante du signal ; elle est définie comme la distance verticale entre le pic et sa ligne de contour la plus basse.
- La largeur minimale d'un pic à mi-hauteur initialisée à 15 canaux (pour une vitesse d'écoulement $v = 7$ cm/s), mais modifiable.
- La distance minimale entre deux pics : initialisée à 45 canaux (pour une vitesse d'écoulement $v = 7$ cm/s), mais modifiable. A la vitesse de 7 cm/s, cet intervalle de temps correspond à une distance de 15,75 μm . Cette distance permet donc de détecter des pics assez proches.

2.5.4. Validation par la forme des signaux

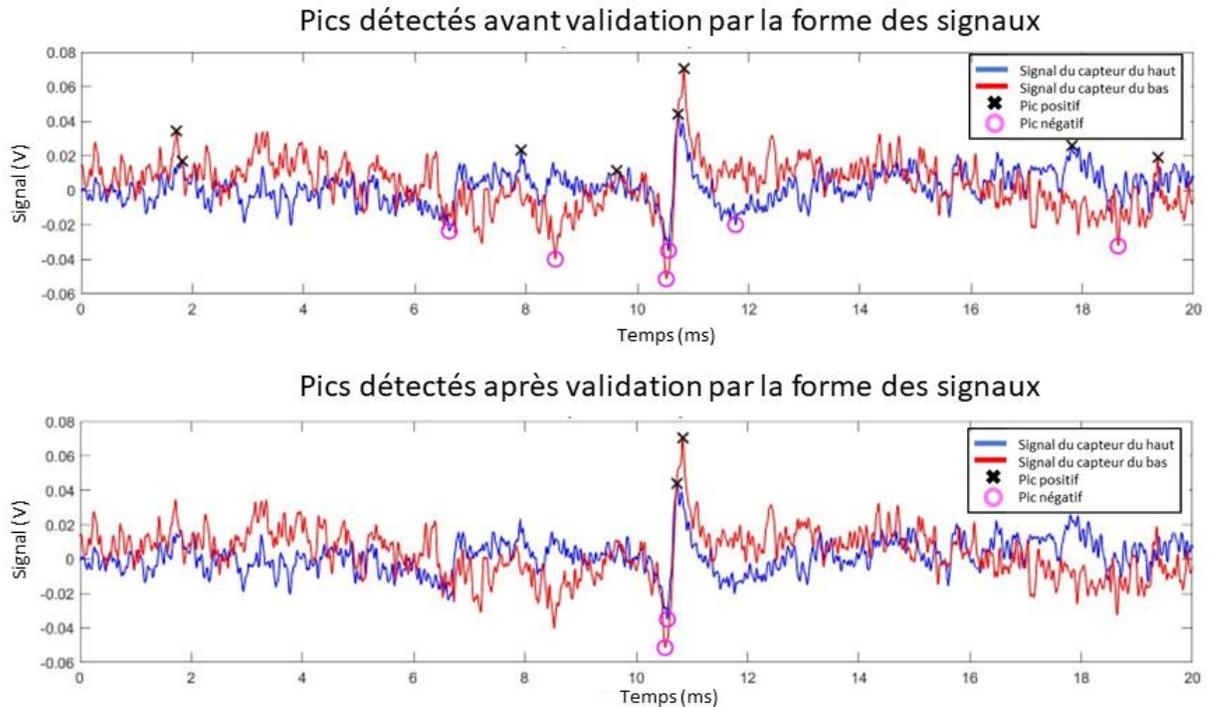


Fig. 2.11 - Validation par la forme

Avant la validation par la forme, de nombreux pics sont détectés. La courbe rouge représente le signal du capteur du bas tandis que la courbe bleue représente celui du capteur du haut. Puis, suite à cette détection initiale, une validation par la forme est effectuée et on observe, par exemple pour le capteur du haut, qu'un seul signal magnétique est détecté. On observe également qu'il coïncide avec un signal magnétique du capteur bas.

Après la détection de tous les pics, seuls les signaux magnétiques doivent être conservés et, à cette fin, la forme caractéristique des signaux est vérifiée. Avant un pic positif, il doit y avoir un pic négatif dans un intervalle compris entre 0 et 120 canaux (Fig. 2.11).

D'après les études de Manon Giraud [1], une bille de 1 μm de diamètre génère un signal magnétique de largeur d'environ 20 μm pour une vitesse de 7 cm/s. Ce qui correspond donc à un signal composé de 57 canaux sur la zone de détection des 4 μm de large du capteur magnétique. Or en réalité la détection de l'objet magnétique se fait également en amont et en aval du capteur GMR, en effet celui-ci va détecter les composantes tangentielles du champ dipolaire généré par les billes magnétiques composant l'objet magnétique avant et après le passage au-dessus du capteur GMR. On peut donc affirmer que le signal d'une bille magnétique est composé en réalité d'une centaine de canaux si l'on considère une détection en amont et en aval du capteur magnétique. Une centaine de canaux est équivalent à une quarantaine de micromètre.

Ainsi pour chaque pic positif, on recherche s'il existe un pic négatif dans l'intervalle initialisé entre 0 et 120 canaux (pour une vitesse d'écoulement $v = 7$ cm/s, mais qui est modifiable). Cet intervalle varie légèrement en fonction de la hauteur de passage de l'objet magnétique, mais ce changement n'empêche pas cette méthode de vérification de fonctionner.

La recherche s'effectue sur la position du maximum/minimum des pics. Ces signaux sont désignés par « signaux valides ». On recherche ensuite les signaux valides dont l'amplitude totale est supérieure à deux fois le bruit. Ces signaux sont désignés par « signaux retenus » dans la recherche des coïncidences.

2.5.5. Recherche des coïncidences

Une fois la validation par la forme du signal effectuée, le filtrage des pics sur les deux capteurs indépendamment est terminé. Ainsi, la dernière condition pour qu'un signal soit validé « magnétique » est qu'il y ait coïncidence entre le capteur du haut et le capteur bas (Fig. 2.12).

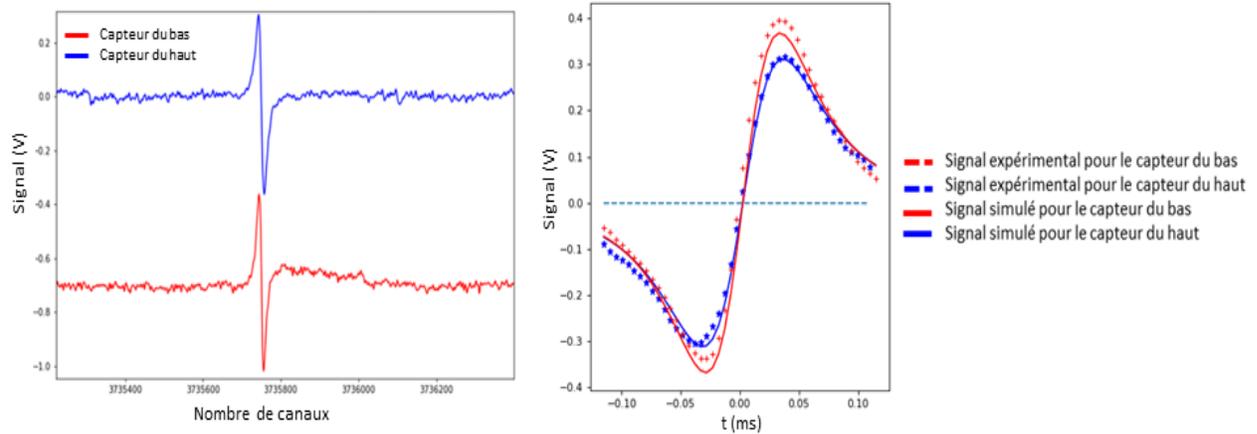


Fig. 2.12 - Graphiques représentant une coïncidence

A gauche, les capteurs du haut et du bas pris séparément, qui détectent simultanément un signal lorsqu'un objet magnétique traverse le canal microfluidique. A droite, une coïncidence où les lignes pleines représentent les fits des signaux mesurés, représentés par des points, avec une vitesse d'écoulement de 30 cm/s.

Un intervalle, qui est le temps minimal pour considérer qu'il s'agit d'une coïncidence entre les signaux du haut et du bas, est défini. Cet intervalle est estimé à 0,1 ou 0,15 ms, soit 20 ou 30 canaux. Une double recherche est ensuite effectuée : une première série de signaux coïncidents est obtenue à partir des signaux retenus du capteur haut et des signaux valides du capteur bas dont les positions médianes (passage par zéro) sont égales ou inférieures à l'intervalle défini. Une seconde série est obtenue en inversant les rôles des deux capteurs. La série définitive des coïncidences est finalement obtenue en recherchant celles qui apparaissent à la fois dans les deux séries, dont on ne garde qu'un exemplaire.

2.5.6. Chi carré

Il est possible que le programme détecte quelques coïncidences provenant en réalité du bruit du signal. En règle générale, il n'y aura pas d'adéquation correcte dans ce cas entre la forme théorique du signal et la forme expérimentale, ce qui peut être vérifié à l'aide d'un test similaire à celui du χ^2 . Empiriquement, nous avons défini la quantité, pour un signal bien représenté sur N canaux d'échantillonnage (Eq. 2.1) :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(Signal_{calc}[i] - Signal_{exp}[i])^2}{Ampl_{signal_exp}} \quad (Eq. 2.1)$$

Où la somme sur i de 1 à N court sur les N canaux englobant la totalité du signal valide considéré. Nous avons déterminé empiriquement une limite supérieure acceptable de $\chi^2_{max} = 2,5$ au-delà de laquelle le signal détecté doit être considéré comme provenant du bruit aléatoire. Ne sont conservées que les coïncidences telles que $\chi^2_{TOP} < \chi^2_{max}$ et $\chi^2_{BOTTOM} < \chi^2_{max}$.

2.5.7. Détermination de la hauteur de passage et du moment magnétique

Une fois les coïncidences détectées, on peut déterminer la hauteur de passage, le nombre de billes magnétiques par objet dans le canal microfluidique et donc le moment magnétique de chaque objet.

Les billes superparamagnétiques composant les différents objets magnétiques sont polarisées le long de l'axe Oz par un champ permanent homogène de 90 mT et acquièrent un moment magnétique induit μ parallèle à Oz. Comme le capteur GMR n'est pas un objet ponctuel, le champ dipolaire généré par un objet magnétique circulant dans le canal avec un vecteur vitesse selon Oy, doit être intégré sur toute la surface du capteur située dans le plan (xy) (**Eq. 1.8** du **chapitre 1** - ne peut pas être utilisée).

Ainsi, le champ dipolaire généré par une bille de moment μ située au point (x_B, y_B, z_B) est détecté par l'ensemble du capteur. L'axe de sensibilité Oy du capteur est colinéaire avec le vecteur vitesse des billes circulant dans le canal microfluidique. La géométrie utilisée pour le capteur, en forme de yoke allongé, le rend insensible aux variations de champ selon l'axe x ou z, de sorte que seule la composante H_y du champ dipolaire est pertinente. Le signal H_y généré sur un capteur a été calculé pour une bille magnétique de coordonnées (x_B, y_B, z_B) et est donné par l'équation (**Eq. 2.4**) [15].

Pour le capteur du bas, la distance de l'objet au capteur s'écrit :

$$h_{bas} = z_B + Z_{espaceur\ bas} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Où $Z_{espaceur\ bas}$ est l'épaisseur de SU-8 2002 qui sépare le canal des capteurs du bas (comme défini dans le **paragraphe 2.3.4**).

Pour le capteur du haut, cette distance vaut :

$$h_{haut} = h - z_B + Z_{espaceur\ haut} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Où h est la hauteur du canal et $Z_{espaceur\ haut}$ l'épaisseur de la colle optique NOA81 utilisée pour coller les capteurs supérieurs au canal (**paragraphe 2.3.4**).

La composante suivant y du champ dipolaire créée par un objet de moment μ situé à la distance h_{obj} d'un capteur peut être exprimée comme suit :

$$\begin{aligned} H_y = & \frac{\mu}{l \times L} \left(\left(\frac{y_l}{q_2^2} \left(\frac{x_r}{r_2} - \frac{x_l}{r_1} \right) + \frac{y_r}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_4} - \frac{x_r}{r_3} \right) \right) \sin \theta \sin \psi \right. \\ & + \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_3} - \frac{1}{r_4} \right) \sin \theta \cos \psi + \left(\frac{h_{obj}}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) \right. \\ & \left. \left. + \frac{h_{obj}}{q_4^2} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \cos \theta \right) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Où:

$$x_r = \frac{L}{2} - x_B$$

$$x_l = -\frac{L}{2} - x_B$$

$$y_r = \frac{L}{2} - y_B$$

$$y_l = -\frac{L}{2} - y_B$$

$$r_1 = \sqrt{x_l^2 + y_l^2 + h_{obj}^2}$$

$$r_2 = \sqrt{x_r^2 + y_l^2 + h_{obj}^2}$$

$$r_3 = \sqrt{x_r^2 + y_r^2 + h_{obj}^2}$$

$$r_4 = \sqrt{x_l^2 + y_r^2 + h_{obj}^2}$$

$$q_2 = \sqrt{y_l^2 + h_{obj}^2}$$

$$q_4 = \sqrt{y_r^2 + h_{obj}^2}$$

On obtient le champ dipolaire détecté par le capteur haut (resp. bas) en remplaçant h_{obj} par h_{haut} (resp. h_{bas}).

Les deux angles θ et φ sont les angles polaire et azimutal du moment μ . L'origine O du référentiel est prise au centre du capteur de longueur L dans la direction x et de largeur $l \ll L$ dans la direction de l'axe sensible y.

Cette expression est en principe valable pour un dipôle ponctuel, mais elle peut être utilisée pour les billes magnétiques de $1 \mu\text{m}$ de diamètre car elles contiennent des nanocores superparamagnétiques de diamètre moyen entre 5 et 10 nm pouvant être considérés comme des moments dipolaires ponctuels.

Dans la présente analyse, les deux angles θ et φ ont été fixés à 0, en considérant des billes idéalement superparamagnétiques dont les moments magnétiques sont parallèles au champ magnétique de 90 mT. Le champ dipolaire H_y prend alors la forme simplifiée donnée par l'équation (Eq. 2.5) :

$$H_y = \frac{\mu}{l \times L} \left(\frac{h_{obj}}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) + \frac{h_{obj}}{q_4^2} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \quad (\text{Eq. 2.5})$$

De plus, les simulations ont montré que le signal produit par un objet contenant N billes superparamagnétiques, de moment individuel μ , réparties aléatoirement sur sa surface, est le même que celui d'un objet magnétique ponctuel dont le moment magnétique est $N \times \mu$. Dans cette étude, les objets biologiques sont donc considérés comme des objets magnétiques ponctuels (**Fig. 2.13**).

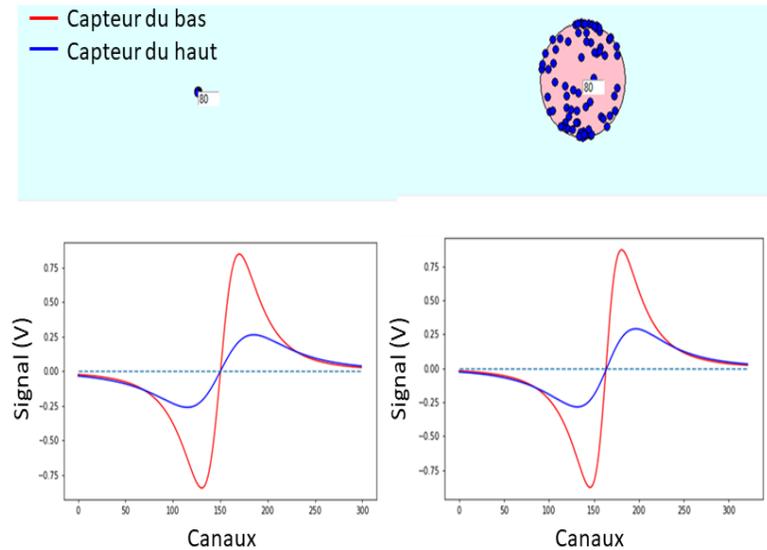


Fig. 2.13 - Simulations pour la détection d'objets biologiques considérés comme des objets ponctuels

Simulations du signal détecté provenant d'un noyau magnétique ponctuel contenant 80 billes (à gauche) et d'un objet biologique de 10 μm de diamètre et labélisé par le même nombre de billes magnétiques (80) (à droite). On peut voir que les signaux détectés dans ces deux cas sont presque identiques. Ceci prouve que nos objets biologiques peuvent être considérés comme des objets ponctuels.

Ensuite, les signaux coïncidents ont été simulés pour 1000 valeurs différentes de la hauteur d'écoulement (z_B) dans le canal microfluidique en utilisant l'équation (**Eq. 2.5**). Pour chaque coïncidence simulée, le rapport entre l'amplitude maximale du signal du capteur du haut et l'amplitude maximale du signal du capteur du bas est calculé. Ce rapport est tracé en fonction de z_B , et la courbe est utilisée comme référence pour nos signaux expérimentaux afin de déterminer la hauteur d'écoulement de l'objet magnétique dans le canal microfluidique. Cette fonction est une fonction strictement croissante de z_B . Elle est représentée sur la **Fig. 2.14** ci-dessous pour $h = 20 \mu\text{m}$ et R_{obj} (rayon de l'objet) = entre 3 et 3,5 μm .

La valeur de z_B obtenue doit être comprise entre R_{obj} et $h - R_{\text{obj}}$. Si le rapport expérimental des amplitudes est inférieur à $f(R_{\text{obj}})$, $z_B = R_{\text{obj}}$ est fixé. Si ce rapport est supérieur à $f(h - R_{\text{obj}})$, $z_B = h - R_{\text{obj}}$ est fixé.

De plus, l'amplitude totale de chaque signal (haut et bas) est proportionnelle au nombre de billes magnétiques qui marquent les objets. Ainsi, le nombre de billes qui compose chaque objet magnétique est obtenu en calculant l'amplitude théorique du signal haut (par exemple) délivré par une seule bille à la cote z_B , puis en divisant par ce nombre l'amplitude du signal haut mesuré.

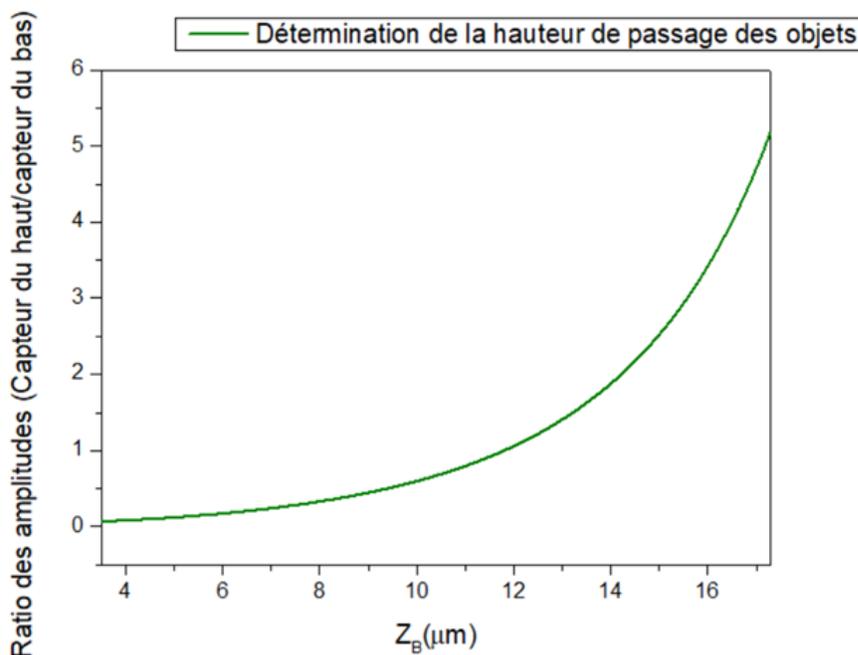


Fig. 2.14 - Fonction $f(z_B)$ reliant le rapport des amplitudes totales des signaux haut et bas en coïncidence à la cote z_B

Rapport entre l'amplitude maximale du signal du capteur haut et l'amplitude maximale du signal du capteur bas en 1000 points. Ainsi, pour chaque rapport calculé, une hauteur d'écoulement peut être extrapolée. Le rayon d'un objet biologique est pris en compte et le canal est de $20\ \mu\text{m}$.

Ainsi une fois que le nombre de billes magnétiques par objet est connu, il est donc possible de connaître le moment magnétique de chaque objet et donc de connaître la nature des objets magnétiques qui passent dans le canal microfluidique.

Il est également possible, grâce à ce programme Python, de calculer le champ dipolaire produit simultanément sur le capteur du haut et du bas par des objets magnétiques contenant un nombre de billes différents, en fonction de leur hauteur de passage z_B dans le canal (**Fig. 2.15**). Ce calcul a été effectué dans les conditions de nos expériences pour des billes de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre (**paragraphe 3.2.2.1**) polarisées par un champ permanent de $90\ \text{mT}$ avec un moment magnétique individuel de $1,56 \times 10^{-14}\ \text{A.m}^2$ et circulant dans un canal microfluidique entre 20 et $26\ \mu\text{m}$ de hauteur, séparé des capteurs haut et bas respectivement par $5\ \mu\text{m}$ de NOA81 et $2\ \mu\text{m}$ de SU8-2002. Le rayon de l'objet biologique est également pris en compte, nos objets biologiques d'intérêt mesurent en moyenne $6\ \mu\text{m}$ de diamètre. La limite de détection (LOD) de $290\ \text{nT}$ est également représentée (**paragraphe 1.4.6.5**).

On constate que les objets magnétiques d'une ou deux billes ne sont jamais détectables par les capteurs GMR et que les objets contenant au moins trois billes (courbes vert foncé) peuvent être détectés simultanément par les capteurs haut et bas lorsqu'ils passent au milieu d'un canal microfluidique de $20\ \mu\text{m}$. En revanche, les objets magnétiques doivent contenir au moins dix billes (courbes orange) pour être détectés simultanément sur toute la hauteur du canal.

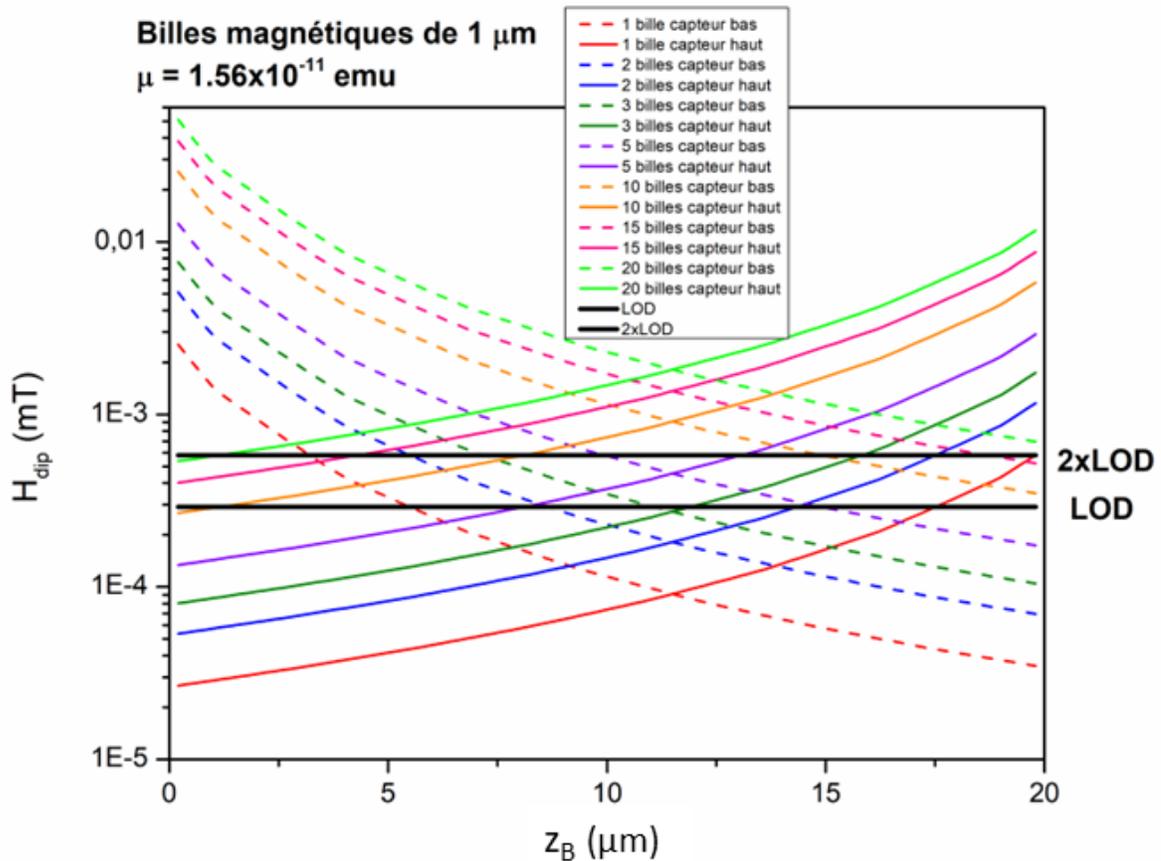


Fig. 2.15 - Champ dipolaire produit simultanément sur les capteurs du haut (courbes pleines) et du bas (courbes en pointillées)

Champ dipolaire pour des objets magnétiques contenant différents nombres de billes, en fonction de leur hauteur z_B dans un canal microfluidique de 20 μm . La limite de détection (LOD) est indiquée. Ce calcul tient compte de l'épaisseur de NOA81 (capteur du haut) et de SU-8 2002 (capteur du bas), c'est pourquoi on observe une légère dissymétrie (paragraphe 4.2.1.1).

Sans oublier que seules les coïncidences dont l'amplitude V_{op} est supérieure ou égale à deux fois le bruit sont sélectionnées. Ainsi pour être détectés, les signaux des objets magnétiques doivent être égaux ou supérieurs à deux LOD donc contenir plus de cinq billes (courbes violettes) pour un canal microfluidique de 20 μm .

2.6. Conclusion

L'utilisation de cette biopuce GMR à deux étages pour la détection dynamique un par un d'objets biologiques marqués, en utilisant des capteurs GMR placés de part et d'autre du canal microfluidique, est très prometteuse pour le développement de tests de diagnostic. En effet, pour la première fois, grâce à cette technique couplée à un traitement robuste des signaux, il est possible de déterminer la hauteur d'écoulement des objets magnétiques circulant dans le canal ainsi que leur moment magnétique et donc de discriminer les agrégats de billes des objets biologiques ciblés. Ceci offre une grande opportunité pour augmenter la spécificité et la sensibilité.

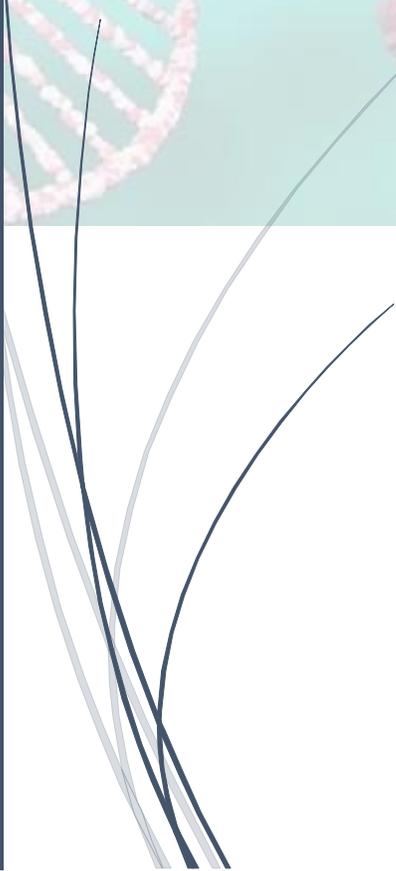
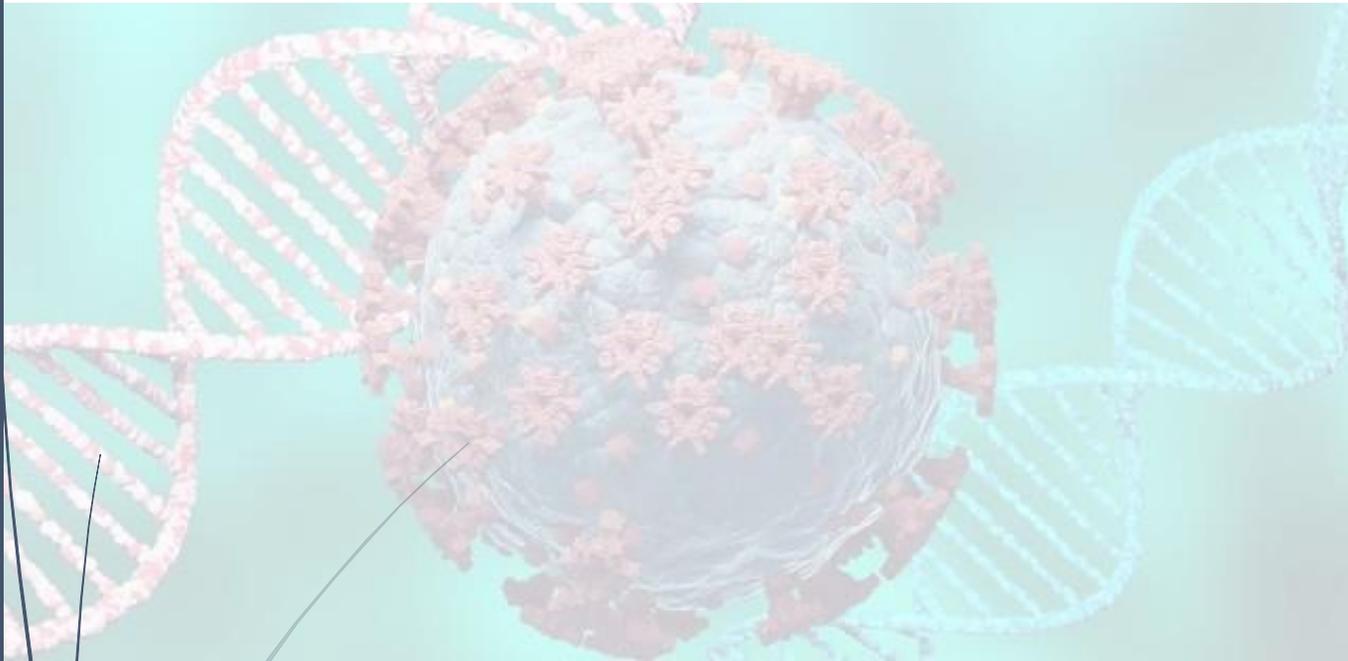
2.7. Références

- [1] Giraud M. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante n.d.:170.
- [2] Bertsch A, Renaud P. Special Issue: 15 Years of SU8 as MEMS Material. *Micromachines* 2015;6:790–2. <https://doi.org/10.3390/mi6060790>.
- [3] Pinto VC, Sousa PJ, Cardoso VF, Minas G. Optimized SU-8 Processing for Low-Cost Microstructures Fabrication without Cleanroom Facilities. *Micromachines* 2014;5:738–55. <https://doi.org/10.3390/mi5030738>.
- [4] Wägli Ph, Homsy A, de Rooij NF. Norland optical adhesive (NOA81) microchannels with adjustable wetting behavior and high chemical resistance against a range of mid-infrared-transparent organic solvents. *Sensors & Actuators: B Chemical* 2011;156:994–1001. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.02.005>.
- [5] Berdichevsky Y, Khandurina J, Guttman A, Lo Y-H. UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2004;97:402–8. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2003.09.022>.
- [6] Agostini M, Greco G, Cecchini M. Polydimethylsiloxane (PDMS) irreversible bonding to untreated plastics and metals for microfluidics applications. *APL Materials* 2019;7:081108. <https://doi.org/10.1063/1.5070136>.
- [7] Lachaux J. Un oxygénateur microfluidique intégré et compact, à haute efficacité de transfert de gaz n.d.:208.
- [8] Lachaux J, Hwang G, Arouche N, Naserian S, Harouri A, Lotito V, et al. A compact integrated microfluidic oxygenator with high gas exchange efficiency and compatibility for long-lasting endothelialization. *Lab on a Chip* 2021. <https://doi.org/10.1039/D1LC00356A>.
- [9] Fernandes AC, Duarte CM, Cardoso FA, Bexiga R, Cardoso S, Freitas PP. Lab-on-Chip Cytometry Based on Magnetoresistive Sensors for Bacteria Detection in Milk. *Sensors* 2014;14:15496–524. <https://doi.org/10.3390/s140815496>.
- [10] Giraud M, Delapierre F-D, Wijkhuisen A, Bonville P, Thévenin M, Cannies G, et al. Evaluation of In-Flow Magnetoresistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool. *Biosensors* 2019;9:105. <https://doi.org/10.3390/bios9030105>.
- [11] Jeckelmann M. Analog front-end design and signal processing for the development of a GMR based biosensor n.d.:57.
- [12] Pamme N. Magnetism and microfluidics. *Lab on a Chip* 2006;6:24–38. <https://doi.org/10.1039/B513005K>.
- [13] Ekelof S. The genesis of the Wheatstone bridge. *Engineering Science & Education Journal* 2001;10:37–40. <https://doi.org/10.1049/esej:20010106>.
- [14] Xiaoning Ye, Hockanson DA, Min Li, Yong Ren, Wei Cui, Drewniak JL, et al. EMI mitigation with multilayer power-bus stacks and via stitching of reference planes. *IEEE Trans Electromagn Compat* 2001;43:538–48. <https://doi.org/10.1109/15.974633>.

[15] 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, 2004;40:3000–2.



3 - Mise au point des conditions expérimentales



Maikane DEROO

3.1. Table des figures & tableaux

Fig. 3.1 - Courbes d'aimantation et du moment magnétique pour les billes commerciales Dynabeads MyOne de 1 μm 96

Fig. 3.2 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées 100

Fig. 3.3 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Micromod 500 nm fonctionnalisées101

Fig. 3.4 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées.....102

Fig. 3.5 - Observation au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) de cellules NS1 labélisées par des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées..... 105

Fig. 3.6 - Effet de la température, de la durée d'immunocapture et de la complexification du milieu sur la labélisation des cellules NS1 par les billes magnétiques.....107

Fig. 3.7 - Labélisation des cellules NS1 dans du serum de veau foetal décomplémenté et dans du plasma de lapin pur107

Fig. 3.8 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD38..... 109

Fig. 3.9 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD184.....109

Fig. 3.10 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d110

Fig. 3.11 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence d'un mélange de billes fonctionnalisées par les anticorps anti-CD138, anti-CD38, anti-CD184 et anti-H-2K^d/H-2D^d..... 110

Fig. 3.12 - Labélisation de cellules NS1 avec différentes concentrations de billes magnétiques Dynabeads fonctionnalisées..... 111

Fig. 3.13 - Deux types de billes sous leur forme commerciale (sans anticorps) dans du milieu de culture..... 113

Fig. 3.14 - Protocole de la réduction de formation d'agrégats par sonication et de la cinétique de suivi des agrégats 113

Fig. 3.15 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 au cours de leur cinétique de conservation 115

Fig. 3.16 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 au cours de leur cinétique de conservation 115

Fig. 3.17 - Illustrations photographiques (microscope optique) de l'incubation des cellules NS1 par les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec des anticorps non spécifiques aux cellules NS1117

Fig. 3.18 - Schéma d'un anticorps.....118

Fig. 3.19 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps IpaD315..... 118

Fig. 3.20 - Protocole de fragmentation F(ab')₂ par digestion pepsique en milieu acide.....120

Fig. 3.21 - Electrophorégramme de contrôle de la fragmentation de l'anticorps IpaD315 par digestion pepsique...121

Fig. 3.22 - Protocole de fragmentation F(ab')₂ par ficinolyse en milieu basique122

Fig. 3.23 - Résultat de la tentative de production de F(ab')₂ IpaD315 par ficinolyse.....123

Fig. 3.24 - Graphique des moments magnétiques à saturation ou à 900 G en fonction du type de billes magnétiques125

Fig. 3.25 - A) Image MEB des billes magnétiques Fe₃O₄-PVA-SiO₂ qui permet de mettre en évidence la monodispersité en taille de particules composites obtenues. B) Détails de la composition des billes magnétiques Fe₃O₄-PVA-SiO₂..126

Fig. 3.26 - Dispersabilité et agrégation des billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 dans du milieu de culture128

Fig. 3.27 - Composition, dispersabilité et agrégation des billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 - $SiCH_2-OH$ 129

Fig. 3.28 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 - NH_2 $Al(OH)_3$ P-COOH fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138.....130

Fig. 3.29 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 -bore quinoline-P-COOH fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138.....131

Tableau 3.1 - Caractéristiques magnétiques des billes commerciales étudiées96

Tableau 3.2 - Exemple type d'un plan d'expérience incluant les échantillons tests et les témoins négatifs.99

Tableau 3.3 - Liste des différents paramètres optimisés pour améliorer la labélisation magnétique des objets biologiques et/ou diminuer l'état d'agrégation des billes magnétiques104

Tableau 3.4 - Cinétique qualitative et quantitative de l'état d'agrégation des billes magnétiques Dynabeads MyOne après fonctionnalisation et sonication114

Tableau 3.5 - Cinétique qualitative et quantitative de l'état d'agrégation des billes magnétiques Adembeads carboxyles 200 nm après fonctionnalisation et sonication.....116

Tableau 3.6 - Caractéristiques magnétiques des billes artisanales synthétisées au LITEN124

Une fois le capteur GMR à deux étages développé ([chapitre 2 -](#)), l'objectif de la thèse est d'en évaluer les performances en tant qu'outil de diagnostic ([chapitre 4 -](#)), en termes de sensibilité de détection, de spécificité et de reproductibilité. Dans un premier temps et c'est ce qui est présenté dans ce troisième chapitre, nous avons dû choisir et mettre en place l'ensemble des outils et matériaux biologiques nécessaires à cette future caractérisation, leur méthode d'utilisation et le cas échéant, en réaliser une optimisation.

- Le choix du modèle biologique d'étude s'est porté sur des cellules eucaryotes provenant du myélome murin NS1. Ce sont des cellules facilement cultivables (puisque'il s'agit de cellules cancéreuses cultivables à l'infini *in vitro*) et dont l'utilisation en tant que modèle d'étude pour caractériser les performances d'une biopuce GMR a déjà été validée (puisque'utilisé au cours de la précédente thèse de Manon Giraud [1]). Pour utiliser ce modèle biologique, il est nécessaire de choisir un ou plusieurs marqueur(s) antigénique(s) connu(s) présent(s) à sa surface, pour le(s)quel(s) des anticorps commerciaux existent, qui permettront la labélisation des cellules au moyen de billes magnétiques fonctionnalisées par les anticorps en question. Différents marqueurs et différents anticorps ont été évalués, dont le récepteur transmembranaire CD138 (aussi appelé Syndecan-1) et un anticorps commercial monoclonal de rat anti-CD138.
- Plusieurs types de billes magnétiques ont été utilisés et plusieurs préparations de billes ont été testées dans la quête d'une suspension colloïdale optimale, pour réduire le nombre de faux positifs.
- Deux contrôles négatifs ont été utilisés pour évaluer la spécificité de détection de la biopuce. Le premier contrôle est un modèle cellulaire facile à cultiver ne présentant pas à sa surface le(s) marqueur(s) biologique(s) ciblé(s) par les anticorps anti-NS1. Ce contrôle négatif, par l'absence de cible biologique dans l'échantillon mais la présence de contaminants, mime parfaitement la réalité d'un échantillon biologique inconnu dans un contexte de diagnostic. Le second contrôle négatif, quant à lui, est constitué uniquement de billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique aux cellules NS1.

3.2. Préparation des échantillons

3.2.1. Lignées cellulaires utilisées

Un modèle biologique d'étude simple, non pathogène et facilement manipulable a été choisi : une lignée cellulaire bien caractérisée constituée de cellules non adhérentes eucaryotes de myélome murin, appelées cellules NS1 (n° ATCC TIB-18). Ce sont des cellules issues de lymphocytes B de souris, dérivées de la lignée P3X63Ag8 (n° ATCC TIB-19), utilisées en routine dans de nombreux laboratoires (dont le LERI) comme partenaire de fusion aux lymphocytes B isolés de souris immunisées, lors de la première étape de production *in vitro* d'anticorps monoclonaux ([paragraphe 1.2.1.2](#)) [2]. C'est aussi le modèle d'étude utilisé pour caractériser le premier prototype de capteur GMR, dit « à un étage » [1], ce qui permettra de comparer aisément les performances et le gain de la deuxième biopuce GMR « à deux étages » par rapport à cette version antérieure.

Une deuxième lignée cellulaire constituée de cellules non pertinentes d'ovaires d'hamster chinois CHO (achetées chez ECACC, Wiltshire, UK) a été utilisée comme contrôle négatif. Il s'agit de cellules épithéliales adhérentes qui sont faciles à cultiver et bien caractérisées puisque'utilisées en routine dans de nombreux laboratoires pour synthétiser des composés thérapeutiques.

3.2.1.1. Culture des cellules NS1

Les cellules NS1 sont cultivées deux fois par semaine dans des plaques de culture à 24 puits. Chaque repiquage, tous les 3 ou 4 jours, consiste à prélever 10 μL de la culture précédente arrivée à confluence (i.e. saturation) pour la réensemencer dans 1 mL de milieu de culture frais. Ce milieu de culture est composé d'une solution RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) dans laquelle sont ajoutés 15 % de sérum de veau fœtal (Gibco) décomplémenté (i.e. chauffé 30 minutes à 56°C pour détruire les composés thermolabiles du complément), 1 % de L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1 % de solution d'acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich), 1 % de pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich) et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C sous 7 % de CO_2 . Deux jours avant chaque expérience, 2 mL de cellules NS1 issues de différents puits de culture sont mis en expansion dans une boîte de Pétri contenant 23 mL de milieu de culture afin d'obtenir une quantité suffisante à la réalisation des tests (environ 10^7 cellules). En début d'expérience, les cellules NS1 sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 RPM à 10°C afin de les concentrer et de les reprendre dans la solution souhaitée (ici, milieu de culture). Après dénombrement à l'aide d'un compteur automatique de cellules TC20 (BioRad) et d'une cellule de Malassez (comptage manuel sous microscope), des dilutions en cascade de 10^2 à 10^5 cellules/mL sont réalisées en milieu de culture : 1 mL de chacune de ces dilutions sera utilisé pour chaque test expérimental et constituera les échantillons cellulaires positifs.

3.2.1.2. Culture des cellules CHO

Les cellules CHO sont cultivées une fois par semaine dans des boîtes de Pétri traitées pour une adhérence optimale. Chaque repiquage hebdomadaire consiste à ensemer une nouvelle boîte de Pétri contenant 12 mL de milieu de culture avec 50 μL de la culture précédente arrivée à confluence. Le milieu de culture est composé de F-12 Nut Mix (Ham) (Gibco) dans lequel sont ajoutés 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco), 1 % de L-glutamine (Sigma-Aldrich), 1 % de solution d'acides aminés non essentiels (Sigma-Aldrich) et 1% de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C sous 5 % de CO_2 . Avant chaque repiquage et expérience, les cellules CHO, adhérentes, sont rincées avec 10 mL de tampon phosphate salin (PBS) avant d'être traitées à la trypsine. Cette protéine a pour rôle de détacher les cellules adhérentes de la boîte de Pétri. Pour les besoins des expériences, la suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes à 1000 RPM à 10°C afin de concentrer les cellules en les reprenant dans un faible volume de milieu de culture. Après dénombrement (compteur automatique TC20 (BioRad) et comptage manuel sur cellule de Malassez), les cellules CHO sont diluées afin d'obtenir la concentration voulue et constituent les échantillons cellulaires témoins négatifs.

3.2.2. Choix et préparation des billes magnétiques

Pour détecter les objets biologiques, qui sont naturellement non magnétiques, il est nécessaire de les labéliser au préalable avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps reconnaissant un marqueur membranaire spécifique. Il existe commercialement un large choix de billes magnétiques aux propriétés bien différentes et possédant diverses protéines ou fonctions réactives à leur surface.

Lors de la thèse de Manon Giraud [1], sept types de billes magnétiques commerciales allant de 50 nm à 2,8 μm de diamètre ont été étudiés. Lors de ces travaux, nous avons étudié trois types de billes commerciales : les billes Carboxyl-Ademtech de 200 nm (Ademtech), les billes Micromod 500 nm et les billes Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Dyna 1) de 1 μm ainsi que des billes désignées spécialement pour ce projet par le Laboratoire d'Innovation pour les Technologies des Energies nouvelles et les Nanomatériaux

(LITEN) sous la tutelle d'Olivier Poncelet afin de répondre à nos problématiques d'agrégation mais aussi pour l'étude d'objets biologiques de plus petite taille ([paragraphe 3.4.2.3](#)).

3.2.2.1. Choix des billes magnétiques

Les trois types de billes commerciales ont été testés lors des expériences afin d'être le plus adapté possible à la taille des objets biologiques étudiés mais également afin de déterminer le ratio du nombre de billes par objets biologiques et du nombre de billes par agrégats [1] pour limiter au maximum les faux positifs.

Les billes Dynabeads MyOne ont été le plus souvent utilisées car elles sont visibles au microscope optique et donc un contrôle visuel de la labélisation des cellules par les billes fonctionnalisées ainsi que de l'agrégation des billes est possible. De surcroît, comme nous le verrons dans le [paragraphe 3.2.2.2](#), elles possèdent un fort moment magnétique rendant la détection des objets biologiques plus facile.

Les Micromods 500 nm ont été utilisées pour quelques expériences seulement avec les cellules NS1.

Les billes Adembeads, quant à elles, ont été utilisées principalement pour les bactéries ([chapitre 5 -](#)). En effet, alors qu'elles s'agrègent énormément ([paragraphe 3.3.1.3](#), [3.4.2.1.2](#) et [3.4.2.1.3](#)) lorsqu'elles sont couplées avec l'anticorps de rat (anti-CD138) utilisé pour l'étude des cellules NS1, les problèmes d'agrégation semblent être moins prononcés dans le cas des bactéries pour lesquelles les anticorps spécifiques utilisés sont des anticorps de souris fabriqués par le LERI.

3.2.2.2. Caractéristiques magnétiques des billes

Les billes étudiées sont toutes composées de cœurs magnétiques d'oxyde de fer recouverts d'une coquille de silice. Elles ont la particularité d'être superparamagnétique ([paragraphe 1.3.5](#)).

L'aimant permanent de 900 G, dans lequel est insérée la biopuce ([paragraphe 2.4.3](#)) polarise les moments magnétiques des billes qui vont générer un champ dipolaire détecté par les capteurs GMR lors de leur passage dans le canal microfluidique.

Les billes magnétiques sont caractérisées par des mesures d'aimantation en fonction du champ (variant de 0 à 2 T) à température ambiante réalisées à l'aide d'un VSM (Vibrating Sample Magnetometer).

Pour chaque lot, l'aimantation M de 50 μL de suspension de billes, dont on connaît au préalable la concentration volumique C (données fournisseur), a été mesurée. La contribution diamagnétique du porte échantillon est une contribution négative linéaire qu'on peut identifier et ajuster quand l'aimantation de l'échantillon atteint la saturation ([Fig. 3.1A](#)).

Elle est ensuite soustraite de l'aimantation totale afin d'obtenir uniquement l'aimantation des billes magnétiques. La variation en champ du moment magnétique μ d'une bille est obtenue en divisant la courbe d'aimantation globale M par la concentration C de billes ([Fig. 3.1B](#)). Cette courbe permet d'extraire la valeur du moment à saturation ainsi que la valeur du moment d'une bille soumise à un champ magnétique de 900 G (champ permanent de notre dispositif expérimental).

La [Fig. 3.1](#) représente la variation en fonction du champ de l'aimantation ([Fig. 3.1A](#)) et du moment magnétique d'une bille ([Fig. 3.1B](#)) pour les billes Dynabeads MyOne de 1 μm de diamètre.

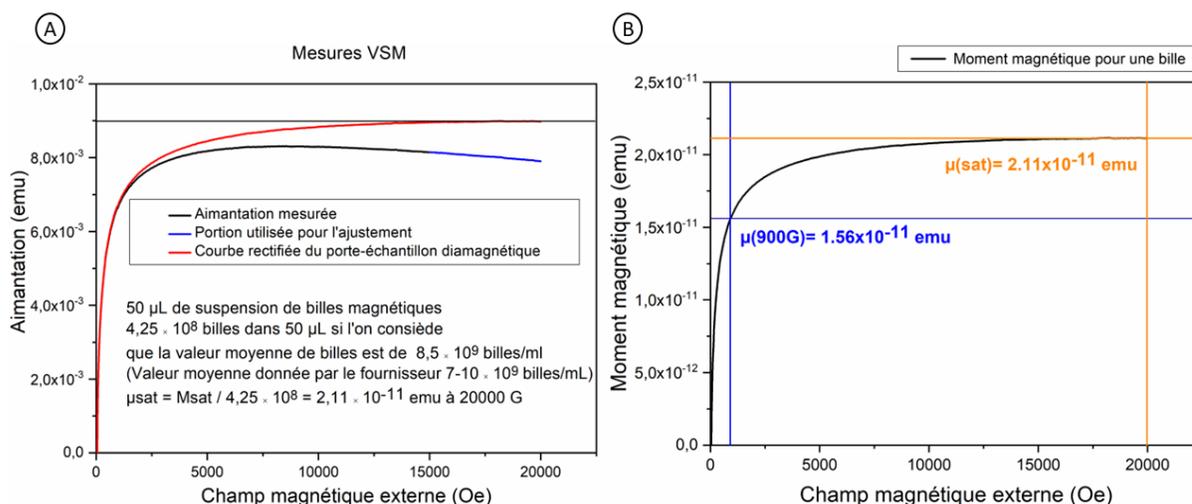


Fig. 3.1 - Courbes d'aimantation et du moment magnétique pour les billes commerciales Dynabeads MyOne de 1 µm
 Mesure VSM pour 50 µL d'une suspension de billes commerciales Dynabeads MyOne avec A: la courbe d'aimantation mesurée et la courbe rectifiée du porte échantillon. Par cette courbe, il est possible de déterminer le moment magnétique à saturation pour une bille et B: la courbe du moment magnétique pour une bille de cette suspension où le moment magnétique à 900 Oe est de $1,56 \times 10^{-11}$ emu pour les billes Dynabeads MyOne.
 $1 \text{ emu} = 10^3 \text{ A.m}^2$

Les résultats des mesures VSM des billes magnétiques commerciales étudiées se trouvent dans le **Tableau 3.1**.

Tableau 3.1 - Caractéristiques magnétiques des billes commerciales étudiées

Billes magnétiques	Billes commerciales		
	Dyna 1	Micromod 500 nm	Adem 200 nm
Diamètre	1 µm	500 nm	200 nm
Moment magnétique à saturation (emu/bille)	$2,11 \times 10^{-11}$	$> 9,2 \times 10^{-12}$	$2,5 \times 10^{-13}$
Moment magnétique à 900 G (emu/bille)	$1,56 \times 10^{-11}$	$5,89 \times 10^{-12}$	$1,27 \times 10^{-13}$

On remarque que pour les Dynabeads MyOne, il y a 24 % d'écart entre le moment magnétique à 900 G et celui à saturation alors que pour les Adembeads, il y a 50 % d'écart. Cela signifie qu'il faudrait peut-être envisager d'utiliser un champ permanent plus fort pour l'étude des Adembeads 200 nm sans pour autant sortir la couche dure du plan.

3.2.2.3. Couplage des billes magnétiques

Pour fonctionnaliser ces billes magnétiques avec des anticorps monoclonaux, il existe différentes solutions de couplage :

- Des couplages covalents qui correspondent à une liaison robuste et irréversible, mais ils sont en général longs à réaliser car tributaire de réactions chimiques aux cinétiques allant de l'heure à quelques heures. Par exemple, il peut s'agir de création de liaison amide entre les fonctions carboxyles (-COOH) présentes en surface des billes magnétiques Carboxyl-Ademeads de 200 nm (Ademtech), préalablement activées en ester actif par l'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) et les fonctions amines primaires des anticorps monoclonaux ([annexe D - 7.4](#) et voir [paragraphe 3.2.2.5](#)). Il existe d'autres possibilités commerciales avec d'autres réactions chimiques de couplage covalent (Dynabeads M-280 tosylactivated, etc.).
- Des couplages par affinité pour lesquels les billes magnétiques commerciales utilisées sont vendues fonctionnalisées par une protéine présentant une forte affinité pour une cible biologique. Par exemple, il peut s'agir de Dynabeads MyOne Streptavidin T1, de billes Micromod 500 nm ou de billes Raybiotech 500 nm portant à leur surface des homo-tétramères de streptavidine à affinité exceptionnellement haute pour la biotine (une des plus fortes interactions connues dans la nature avec une constante de dissociation (K_D) de l'ordre de 10^{-14} mol/L). Il est donc indispensable de biotinyler préalablement les anticorps monoclonaux d'intérêt pour fonctionnaliser de telles billes avec ces anticorps ([annexes E - 7.5](#) et [F - 7.6](#) et voir [paragraphe 3.2.2.4](#)). Ce type de liaison streptavidine/biotine est robuste mais pas irréversible, et le couplage des anticorps biotinylés aux billes est très rapide (30 minutes). Il existe d'autres possibilités commerciales (protéine A ou protéine G de forte affinité pour les immunoglobulines, etc.).

Les anticorps utilisés pour fonctionnaliser les billes magnétiques sont uniquement des anticorps monoclonaux ([paragraphe 1.2.1](#), anticorps sélectionnés et cultivés pour leur capacité à produire un anticorps particulier).

Nous en avons évalué plusieurs ([paragraphe 3.4.1.3](#)), toutefois l'anticorps majoritairement utilisé est un anticorps monoclonal purifié de rat d'isotype IgG2a dirigé contre le récepteur membranaire CD138 de souris, présent en surface des cellules NS1. Il s'agit d'un anticorps commercial acheté chez BD Pharmingen (clone 281-2, référence 553712).

3.2.2.4. Fonctionnalisation des billes magnétiques Dynabeads et des billes Micromod 500 nm

3.2.2.4.1. Biotinylation des anticorps

100 µg d'anticorps (i.e. environ 0,66 nmol) sont dilués dans 400 µL final de tampon borate 0,1 M pH 9,0. Ensuite, 6 µL de biotine (biotinamidohexanoic acid N-hydroxy-succinimide ester) à 1 mg/mL en DMF (N,N-diméthylformamide) sont ajoutés à la solution d'anticorps (ratio de couplage = 20 molécules de biotine par molécule d'anticorps) et le mélange réactionnel est incubé pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre au groupe NHS (N-hydroxy-succinimide ester) de la biotine de réagir avec les fonctions amines primaires de l'anticorps en formant une liaison covalente. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 100 µl de tampon Tris (2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) 1 M pH 8.0 pendant 15 minutes à température ambiante afin d'inactiver la biotine n'ayant pas réagi. En raison de l'excès de biotine, les anticorps biotinylés produits doivent être purifiés. Pour cela, une purification par chromatographie d'exclusion est réalisée à l'aide d'une petite colonne de dessalage Zeba Desalt Spin (Thermo Scientific), l'anticorps biotinylé (de haut volume hydrodynamique, 150 kDa) étant séparé de la biotine libre (de plus petite taille, 454,5 Da) par force centrifuge (1000 g 2 minutes) dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,4 avec chlorure de sodium 0,15 M. La concentration finale en anticorps biotinylés purifiés est

déterminée par spectrophotométrie à 280 nm et 320 nm en utilisant la loi de Beer-Lambert (Eq. 3.1). Les solutions d'anticorps préparés sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

$$C_{\text{Anticorps biot}} = \frac{Abs_{280} - Abs_{320}}{\epsilon l} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Où la concentration est exprimée en mg.mL⁻¹, ϵ est le coefficient d'extinction massique des anticorps (environ 1,4 mL.mg⁻¹.cm⁻¹) et l la longueur du trajet optique (ici 1 cm).

3.2.2.4.2. Immobilisation des anticorps biotinylés en surface des billes

Selon le protocole commercial (adapté également pour les billes Micromod 500 nm), après trois lavages sur aimant de 1 mg de billes dans du PBS, 20 µg d'anticorps biotinylés purifiés sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, les billes fonctionnalisées sont lavées quatre fois dans du PBS contenant 0,1 % de BSA (albumine de sérum bovin assurant la saturation des sites d'accrochage non spécifiques en surface des billes) et en utilisant un aimant externe pour éliminer les anticorps biotinylés non couplés. Les billes magnétiques sont ensuite conservées à 4°C à une concentration finale de 5 mg/mL (ou 4,25 × 10⁹ billes/mL).

3.2.2.5. Fonctionnalisation des billes magnétiques Carboxyl-Adembeads 200 nm (Ademtech)

Bien que les billes Dynabeads MyOne aient été le plus souvent utilisées lors des différentes expériences, nous avons tenté de réaliser quelques essais avec des billes Carboxyl-Adembeads de 200 nm de diamètre. En effet, ces dernières billes, plus petites, labélistent certainement mieux magnétiquement nos objets biologiques, puisqu'il semble, en théorie, possible d'en recouvrir d'un plus grand nombre la surface des cellules NS1 (pourvu que le nombre d'antigènes ciblés par les anticorps ne soient pas limitants en surface des cellules). Par contre, comme nous l'avons évoqué précédemment, elles ont tendance à s'agréger fortement en présence de l'anticorps anti-CD138.

D'autre part, les billes de plus petit diamètre sont surtout intéressantes pour la détection de bactéries (objets biologiques plus petits que les cellules NS1) que nous étudierons dans le [chapitre 5](#) -.

La fonctionnalisation de ces billes commerciales avec des anticorps monoclonaux a été réalisée conformément aux recommandations du fabricant. Brièvement, les billes commerciales en suspension à 3 % massique sont prélevées et lavées deux fois en tampon d'activation 1X (fourni par Ademtech) au moyen d'un aimant externe afin d'obtenir une solution de billes à 1 % massique final. 80 µL d'une solution d'EDC préparée extemporanément à 4 mg/mL en tampon d'activation 1X sont ajoutés par mg de billes pour activer les groupes carboxyles de surface en ester actifs. Le mélange est incubé 10 minutes à 37°C sous agitation à 150 RPM. Ensuite, 25 µg d'anticorps sont ajoutés par mg de billes. Une nouvelle incubation de 2 h à 37°C sous agitation à 150 RPM permet le couplage covalent des amines primaires des anticorps sur les groupes esters activés des billes. Ensuite, 200 µL de BSA à 0,5 mg/mL en tampon d'activation 1X sont ajoutés pour 100 µL de billes fonctionnalisées. Le mélange est incubé une dernière fois 30 minutes à 37°C sous agitation à 150 RPM pour assurer la saturation des sites non spécifiques ou n'ayant pas réagi. Après 2 lavages des billes fonctionnalisées en tampon de stockage 1X (fourni par Ademtech) pour éliminer les anticorps non couplés, les billes magnétiques sont conservées en tampon de stockage à 4°C à une concentration finale de 5 mg/mL (ou 5 × 10¹¹ billes/mL).

3.3. Protocole expérimental

3.3.1. Immunocapture des cellules NS1

3.3.1.1. Avec les billes dynabeads MyOne

Sachant qu'une cellule NS1 a un diamètre moyen de 6 μm , le calcul de l'occupation stérique $N = 4\pi R_{\text{cellules}}^2 / \pi R_{\text{billes}}^2$ montre que, théoriquement, une cellule peut être marquée au maximum par environ 150 billes de 1 μm de diamètre. Afin d'optimiser le marquage magnétique des cellules, il est nécessaire que les billes soient surnuméraires. Après différents essais, Manon Giraud [1] a déterminé que $1,5 \times 10^7$ billes convenaient parfaitement pour immunocapturer et labéliser magnétiquement une quantité maximale de 10^5 cellules NS1 (excès minimum de billes d'un facteur 150 par rapport au nombre de cellules).

Une fois les cellules NS1 et CHO dénombrées comme décrit précédemment ([paragraphes 3.2.1.1 et 3.2.1.2](#)), $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques fonctionnalisées sont ajoutées à chaque suspension cellulaire préparée de 1 mL (10^2 à 10^5 cellules/mL en milieu de culture).

Un exemple de plan-type d'expérience est présenté dans le [Tableau 3.2](#). Les contrôles négatifs sont systématiquement inclus à toute expérience.

Tableau 3.2 - Exemple type d'un plan d'expérience incluant les échantillons tests et les témoins négatifs.

<i>Echantillons (1 mL)</i>	<i>Types d'échantillon</i>
<i>10^2 cellules NS1 + $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	Echantillons tests
<i>10^3 cellules NS1 + $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	
<i>10^4 cellules NS1 + $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	
<i>10^5 cellules NS1 + $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	
<i>10^5 cellules CHO + $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	Contrôles négatifs
<i>$1,5 \times 10^7$ billes magnétiques anti-CD138</i>	

Selon les expériences, les concentrations des différents échantillons peuvent varier afin de déterminer plus finement la sensibilité de détection du test.

Ensuite, tous les échantillons sont incubés sous agitation 2 heures afin que les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique des cellules NS1 (anti-CD138) puissent immunocapturer correctement leur cible, les cellules NS1.

Après les 2 heures d'immunocapture, un contrôle visuel des échantillons est effectué au microscope optique (grossissement 40X) pour vérifier la labélisation correcte des cellules par les billes magnétiques fonctionnalisées.

L'agrégation des billes magnétiques est également appréciée. Une étude statistique a été réalisée sur des dizaines de photos prises au microscope et il a été montré, à l'aide des logiciels ImageJ et Paintshop pro,

que les cellules NS1 sont marquées en moyenne par 50 billes, avec une distribution entre 20 et 80 billes. Environ 7% des cellules ne sont pas marquées et 98 % des cellules marquées le sont avec plus de 7 billes (Fig. 3.2).

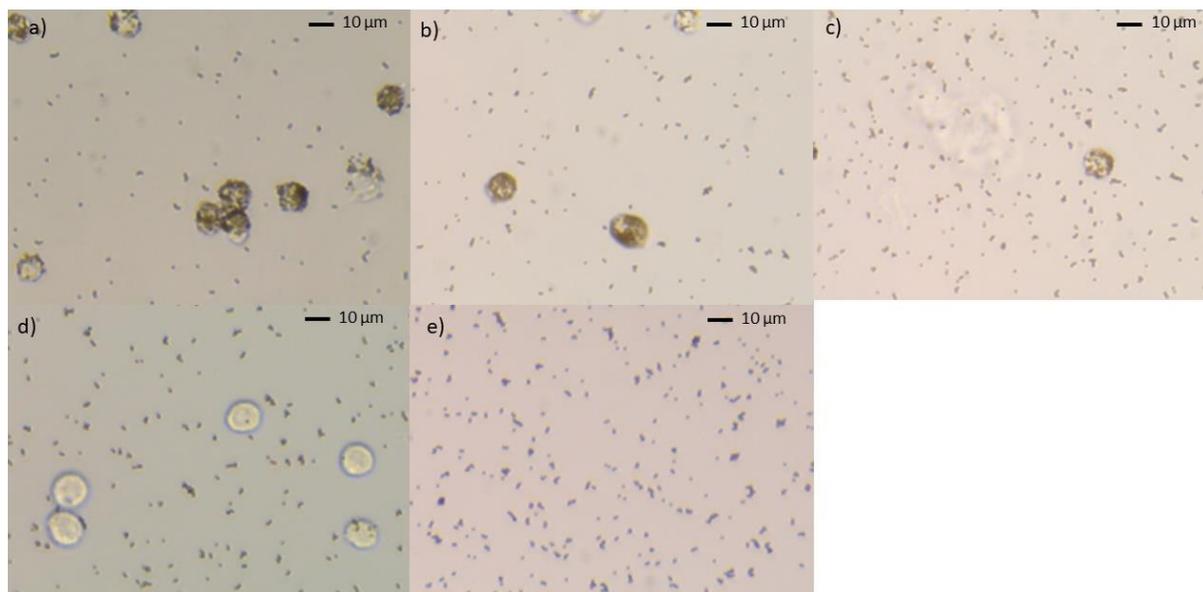


Fig. 3.2 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées

1,5 × 10⁷ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10⁵ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10⁴ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, c) 10³ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, d) 10⁵ cellules CHO dans un volume final de 1 mL ou e) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

3.3.1.2. Avec les billes Micromod 500 nm

Bien que les billes Dynabeads MyOne soient les plus utilisées pour la détection GMR des cellules NS1 car la labélisation des cellules est très efficace et l'état d'agrégation plutôt faible, quelques expériences ont été réalisées avec des billes de plus petite taille. Théoriquement, le nombre de billes $N = 4\pi R_{cellules}^2 / \pi R_{billes}^2$ labelisant les objets biologiques devrait être plus grand et l'écart entre ce nombre N et le nombre de billes constituant les agrégats devrait augmenter, permettant d'améliorer encore la distinction entre les signaux spécifiques et les faux positifs.

Les billes Micromod 500 nm ont donc été testées. Sachant qu'une cellule NS1 a un diamètre moyen de 6 μm, le calcul de l'occupation stérique $N = 4\pi R_{cellules}^2 / \pi R_{billes}^2$ montre que, théoriquement, une cellule peut être marquée au maximum par environ 600 billes de 500 nm de diamètre. Afin d'optimiser le marquage magnétique des cellules, il est nécessaire que les billes soient surnuméraires. Après différents essais, Manon Giraud [1] a déterminé que 10⁸ billes convenaient parfaitement pour immunocapturer et labéliser magnétiquement une quantité maximale de 10⁵ cellules NS1 avec des billes Micromod 500 nm.

Ensuite, tous les échantillons sont incubés sous agitation 2 heures afin que les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique des cellules NS1 (anti-CD138) puissent immunocapturer correctement leur cible, les cellules NS1.

Après ces 2 heures d'immunocapture, un contrôle visuel des échantillons est effectué au microscope optique (grossissement 40X) pour vérifier d'une part si la labélisation des cellules par les billes magnétiques fonctionnalisées est correcte, et d'autre part pour estimer l'agrégation des billes magnétiques. Une étude statistique a été réalisée sur des dizaines de photos prises au microscope et il a été montré, à l'aide des logiciels ImageJ et Paintshop pro, que les cellules NS1 sont marquées en moyenne par 30 billes, avec une distribution entre 10 et 80 billes. Sachant qu'environ 5 % des cellules ne sont pas marquées (**Fig. 3.3**).

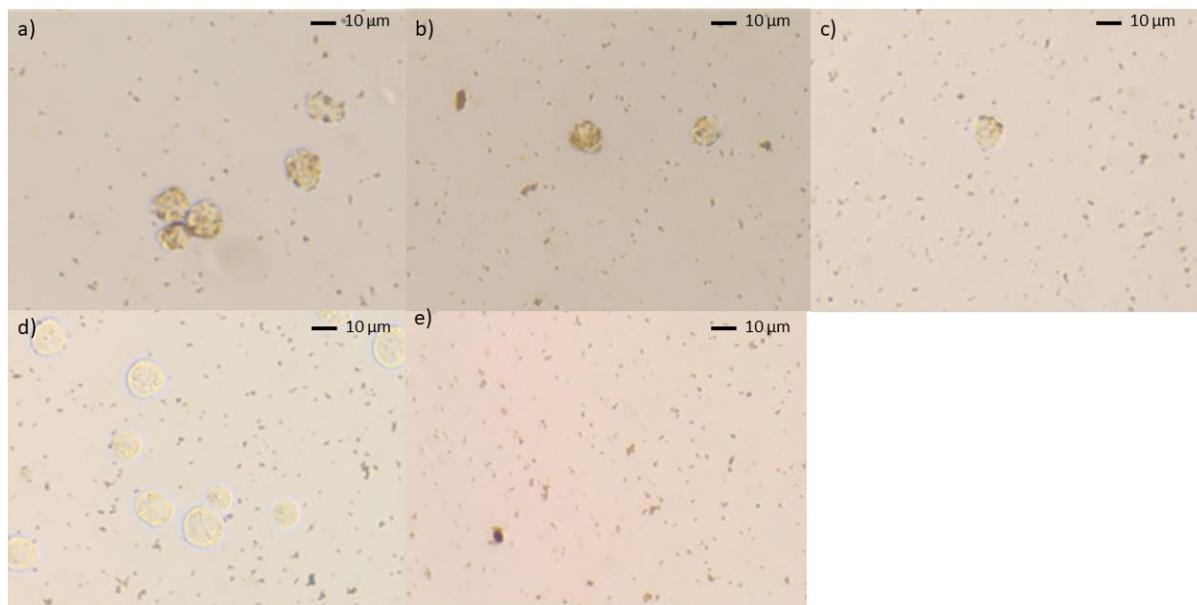


Fig. 3.3 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Micromod 500 nm fonctionnalisées

10^8 billes magnétiques Micromod 500 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10^4 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, c) 10^3 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, d) 10^5 cellules CHO dans un volume final de 1 mL ou e) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

La labélisation avec ces billes n'est donc pas à la hauteur des prédictions théoriques. Le moment magnétique étant plus faible que celui des Dynabeads 1 µm (**Tableau 3.1**), et le nombre de billes fonctionnalisées à la surface des cibles NS1 n'étant pas plus important, le signal détecté sera plus faible.

3.3.1.3. Avec les billes Adembeads 200 nm

L'utilisation de billes comme les Adembeads de diamètre 200 nm pourraient présenter un grand intérêt dans le cadre de notre projet, en particulier pour étudier des objets biologiques plus petits comme les bactéries (taille moyenne autour de 1 µm contre environ 5 à 8 µm pour les cellules NS1). Les billes Adembeads de 200 nm de diamètre pourraient convenir par leurs propriétés magnétiques mais elles s'agrègent considérablement une fois fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138.

Sachant qu'une cellule NS1 a un diamètre moyen de 6 µm, le calcul de l'occupation stérique $N = 4\pi R_{cellules}^2 / \pi R_{billes}^2$ montre que, théoriquement, une cellule peut être marquée au maximum par environ 3600 billes de 200 nm de diamètre. Afin d'optimiser le marquage magnétique des cellules, il est nécessaire que les billes soient surnuméraires. Après différents essais, Manon Giraud [1] a déterminé que 10^9 billes convenaient parfaitement pour immunocapter et labéliser magnétiquement une quantité maximale de 10^5 cellules NS1.

Après les 2 heures d'immunocapture, un contrôle visuel des échantillons est effectué au microscope optique (grossissement 40X) pour vérifier la labélisation correcte des cellules par les billes magnétiques fonctionnalisées. L'agrégation des billes magnétiques est également appréciée. Une étude statistique n'a pu être réalisée au vu de l'importance des agrégats et l'impossibilité de vérifier si les cellules sont réellement labélisées ou si les agrégats les recouvrent uniquement sans immunocapture. De plus, les expériences sur les cellules CHO n'ont pas été réalisées du fait de la non spécificité de ce type de billes (Fig. 3.4).

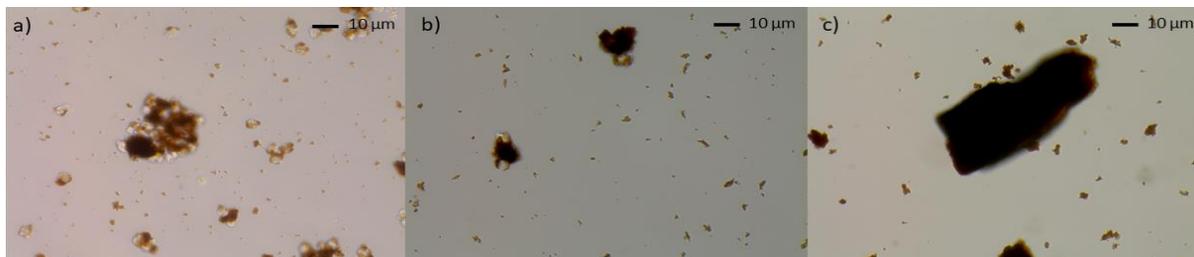


Fig. 3.4 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons positifs et de contrôles négatifs avec des billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées

10⁹ billes magnétiques Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10⁵ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10⁴ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, ou c) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

3.3.2. Mise en place de l'expérience

Une fois les échantillons préparés au LERI, l'expérience a lieu au LNO. Pour la mise au point de ce prototype de test de diagnostic, les expériences sont réalisées dans une chambre bas bruit [3]. Dans l'optique de rendre notre dispositif entièrement transportable, les expériences devront être réalisées en dehors de cette chambre en utilisant par exemple un capteur de référence en dehors du canal microfluidique [4] [5].

Les échantillons sont placés sur une roue en attendant leur passage dans la biopuce, afin d'éviter la création d'agrégats ainsi que la sédimentation des cellules.

Lorsque la biopuce est placée sur son support, dans l'aimant permanent du montage, il est nécessaire de recalibrer la sensibilité avant le début de l'expérience pour atteindre une sensibilité identique sur les deux capteurs. En effet, avoir la même sensibilité sur les deux capteurs facilitera l'analyse ultérieure des signaux mesurés. Ces signaux émis pour un même objet magnétique par le capteur du haut et celui du bas sont appelés « coïncidences ».

La position optimale est trouvée en appliquant un champ magnétique alternatif et en déplaçant la puce à l'aide de trois vis micrométriques placées sur le porte-échantillon jusqu'à ce que l'optimum soit trouvé. L'optimum est atteint lorsque la tension de sortie crête à crête la plus élevée V_{pp} est atteinte sans l'apparition de RTN, en effet la position où la sensibilité est maximale est aussi celle où le RTN est le plus présent. A partir de cette position optimale, le calcul de la sensibilité [6] [7] s'effectue à l'aide de l'équation (Eq. 3.2):

$$S = \frac{V_{PP} \times 100}{H_{appliqué} \times V_0 \times G} \quad \text{(Eq. 3.2)}$$

Où $G = 8600$ est le gain d'amplification et $V_0 = 1 \text{ V}$ (tension d'alimentation des capteurs)

$H_{appliqué}$ est généré par des bobines de Helmholtz de 5 cm de rayon, positionnées de part et d'autre de l'aimant permanent, et alimentées par un courant sinusoïdal (100 mA - 1000 Hz). $H_{appliqué}$ a été mesuré à

l'aide d'une bobine de détection dont le support a été imprimé en 3D avec un rayon de 1,7 cm et constitué de 3003 tours de fil (Eq. 3.3). L'amplitude du champ varie en fonction de la fréquence en raison de l'aimant permanent qui entoure la puce.

$$B_{pp} = \frac{U_{PP}}{2 \times \pi^2 \times f \times N \times R^2} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Après mesure, $H_{\text{appliqué}}$ est de 0,184 G.

Une fois la calibration effectuée, le champ magnétique de calibration est désactivé et avant d'injecter l'échantillon, un blanc de 20 secondes est enregistré pour déterminer le bruit expérimental. Il est typiquement de 40 mV crête à crête en moyenne à la sortie après une amplification de 8600 (4,6 μ V par rapport au bruit d'entrée).

La limite de détection des signaux est définie comme le champ H induisant un rapport signal/bruit (SNR) de 1. Elle a été estimée à 290 nT (paragraphe 1.4.6.5).

Dans la plupart des expériences réalisées durant cette thèse, sur le volume disponible d'échantillon de 1 mL, 200 μ L sont introduits dans le canal microfluidique. Plus récemment, lors des dernières expériences réalisées, l'intégralité du volume d'échantillon disponible (1 mL) a été analysé afin de détecter l'ensemble des objets biologiques présents pour une sensibilité optimale. Un flux d'azote est utilisé pour pousser les échantillons dans le canal microfluidique à une pression de 345 mbar et les échantillons circulent à une vitesse moyenne de 20 cm/s. En général, les premiers échantillons analysés sont les échantillons tests (attendus positifs) passés en concentration croissante, pour terminer par les contrôles négatifs. L'inverse est également possible et cela démontre que l'ordre de passage n'influe pas sur les expériences.

Après le passage de chaque échantillon dans le canal, au moins 200 μ L de milieu de culture sont introduits afin de récupérer les quelques signaux des cellules éventuellement encore présentes dans les tubulures.

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 dans un fichier. La fréquence d'acquisition a été fixée à 200 kHz, elle doit être adaptée à la vitesse des échantillons dans le canal afin d'avoir un nombre minimum de points enregistrés par signal, garantissant une reconstruction sans distorsion des pics.

Une fois l'expérience terminée, les signaux magnétiques obtenus pour chaque échantillon sont analysés avec le programme Python décrit dans le paragraphe 2.5.

3.4. Optimisation de la préparation des échantillons biologiques magnétiquement marqués

Pour gagner en sensibilité de détection avec la biopuce GMR à deux étages, il est important de rechercher les conditions optimales permettant la plus grande distinction possible entre le nombre de billes magnétiques fixées à la surface des objets biologiques cibles à détecter et le nombre de billes contenu dans les agrégats de billes excédentaires (l'idéal absolu étant une suspension de billes parfaitement colloïdale, non agrégée). Il est pour cela possible de jouer sur plusieurs paramètres qui ont fait l'objet de recherche d'optimisation durant ces trois années de thèse (Tableau 3.3) :

- Assurer une immunocapture optimale (choix des billes ([paragraphe 3.2.2.1](#)), durée, nature des anticorps utilisés, quantité de billes, etc.) pour une labélisation magnétique des objets biologiques la plus marquée possible.
- Limiter au maximum l'état d'agrégation des billes magnétiques.

Tableau 3.3 - Liste des différents paramètres optimisés pour améliorer la labélisation magnétique des objets biologiques et/ou diminuer l'état d'agrégation des billes magnétiques

PARAMETRES	ESSAIS	CONCLUSION
LABELISATION MAGNETIQUES DES CELLULES	<ul style="list-style-type: none"> • Vérification de la labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne au MEB « environnemental » • Labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne dans différents milieux biologiques • Labélisation des cellules NS1 par des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec différents anticorps spécifiques et contrôle de l'état d'agrégation de ces billes fonctionnalisées • Labélisation des cellules NS1 avec différentes quantités de billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées 	<p>Concluant</p> <p>Possible</p> <p>Aucune amélioration</p> <p>Amélioration possible</p>
AGREGATION DES BILLES MAGNETIQUES FONCTIONNALISEES	<ul style="list-style-type: none"> • Sonication des billes Dynabeads MyOne et Adembeads • Fonctionnalisation des billes au moyen de fragments $F(ab')_2$ • Fabrication de nouvelles billes plus petites et avec une forte stabilité colloïdale (billes LITEN) 	<p>Aucune amélioration</p> <p>Echec de la production des $F(ab')_2$</p> <p>En cours</p>

3.4.1. Immunocapture des objets biologiques

Afin de visualiser ou d'améliorer la labélisation des objets biologiques par les billes magnétiques fonctionnalisées, plusieurs tests ont été réalisés ([Tableau 3.3](#)).

3.4.1.1. Vérification de la labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne par Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEBE)

Afin de vérifier et quantifier plus finement que par microscopie optique (Fig. 3.2), la labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne, des observations au microscope à balayage électronique (MEB) (Fig. 3.5) ont été réalisées chez le groupe Zweiss à Cergy Pontoise.

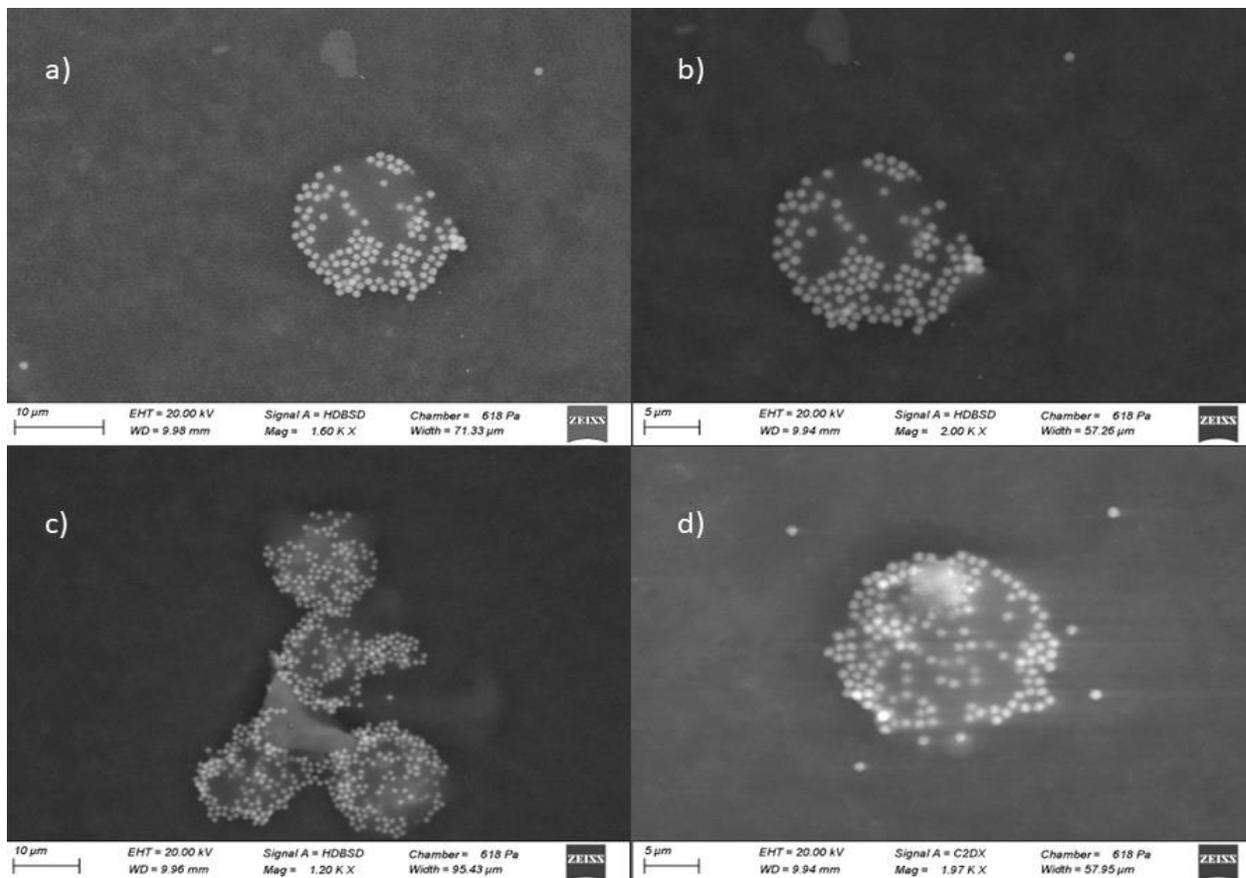


Fig. 3.5 - Observation au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) de cellules NS1 labélisées par des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées

En moyenne, plus de 50 billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 sont fixées à la surface de chaque cellule. Les photos a), b) et d) représentent une ou deux cellules si on tient compte de l'échelle, tandis que la photo c) représente un cluster de plusieurs cellules.

Pour visualiser la surface d'un échantillon sur un MEB conventionnel, capable de produire des images de haute résolution par interaction électron-matière, il est nécessaire de préparer l'échantillon en le déshydratant et en le rendant conducteur par une fine couche métallique déposée à sa surface. Pour des cellules composées à 85 % d'eau, cela en devient compliqué. En effet, elles explosent durant le processus de séchage. C'est pourquoi, nous avons utilisé un MEB dit « environnemental » [8] qui permet d'étudier les objets biologiques sans aucune préparation des échantillons. Il peut fonctionner à des pressions élevées, réguler la température grâce à une platine Peltier permettant d'étudier directement des échantillons hydratés et de former des images à basse tension pour visualiser des échantillons non conducteurs sans étape de métallisation préalable.

Grâce à cette technique, les cellules NS1 labélisées par les billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 ont pu être observées. Comme l'illustre la Fig. 3.5, les cellules

sont labélisées par plus de 50 billes en moyenne (une seule face de la cellule étant visible sur les photographies).

3.4.1.2. Labélisation des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne dans différents milieux biologiques et durée/température d'immunocapture

3.4.1.2.1. PBS, PBS+BSA+EDTA et milieu de culture

La preuve de concept et l'évaluation des performances du premier prototype de biopuce à capteur GMR à un étage a été réalisé dans un milieu très simple : du PBS, autrement dit un tampon à pH physiologique contenant ions et sels [1] [9]. Avec le développement de la deuxième version améliorée de la biopuce que nous avons appelée « capteur deux étages » (du fait de la double détection des objets magnétiques par les capteurs GMR répartis au-dessus et en dessous du canal microfluidique), nous avons souhaité évaluer les performances de ce nouveau dispositif à visée « diagnostic » dans un milieu plus complexe et plus représentatif des échantillons cliniques, qui sont la cible finale visée. Nous avons donc progressivement complexifié le milieu d'étude, depuis le PBS, à du PBS complété en protéine (0,5 % BSA) et 2 mM d'EDTA (acide éthylène-Diamine-tétra-Acétique, connu pour limiter les clusters de cellules), jusqu'à du milieu de culture (milieu physiologique, contenant ions et sels, mais aussi très riche en acides aminés, protéines diverses, nutriments et, surtout, contenant 15 % de sérum de veau fœtal).

Deux températures d'immunocapture ont également été testées (4°C et 20°C) ainsi que différentes durées (30 minutes, 1 heure et 2 heures).

Les échantillons obtenus après une heure d'immunocapture à 4°C et 20°C ont également été mis en attente pendant 3h45 à température ambiante (durée maximale d'attente des échantillons entre l'immunocapture réalisée au LERI et l'analyse sur la biopuce GMR au LNO) afin de voir si la labélisation est modifiée.

Ces essais ont été réalisés avec 10^5 cellules NS1/mL en présence de $1,5 \times 10^7$ billes/mL Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138.

Le nombre moyen de billes magnétiques par cellules (pour chaque temps de cinétique et température d'immunocapture) a été déterminé par analyse des photos prises au microscope, à l'aide des logiciels ImageJ et PaintShop pro, et est présenté sur la [Fig. 3.6](#).

On peut constater que, dans tous les milieux et pour les deux températures, une immunocapture de 30 minutes semble insuffisante et ne permet pas une labélisation optimale des cellules NS1. Cette labélisation semble atteindre un début de saturation à partir de 1 h, avec une sensible amélioration pour 2 h d'immunocapture. C'est pour cette raison que cette durée d'immunocapture a été choisie, toutefois sans nécessairement trop de perte si elle était raccourcie à 1 h (à l'exception du PBS à 20°C, arctéfact ?). Nous avons opté pour une immunocapture réalisée à température ambiante plutôt qu'à 4°C car plus simple à mettre en œuvre (pour un objectif au chevet du patient) et avec des résultats de labélisation sensiblement comparables. Enfin, nous pouvons remarquer qu'à l'exception du PBS à 20°C (arctéfact ?), le PBS et le milieu de culture permettent d'assurer de bonnes labélisations des cellules NS1 : la complexification du milieu ne semble pas être, pour l'instant, un frein majeur. La labélisation des cellules NS1 est moins bonne dans le milieu PBS+BSA+EDTA sans aucune explication possible. La très grande majorité des expériences menées au cours de ces trois années de thèse ont donc été réalisées en milieu de culture, bien plus représentatif que le PBS et des échantillons cliniques que cible cette biopuce à visée diagnostic.

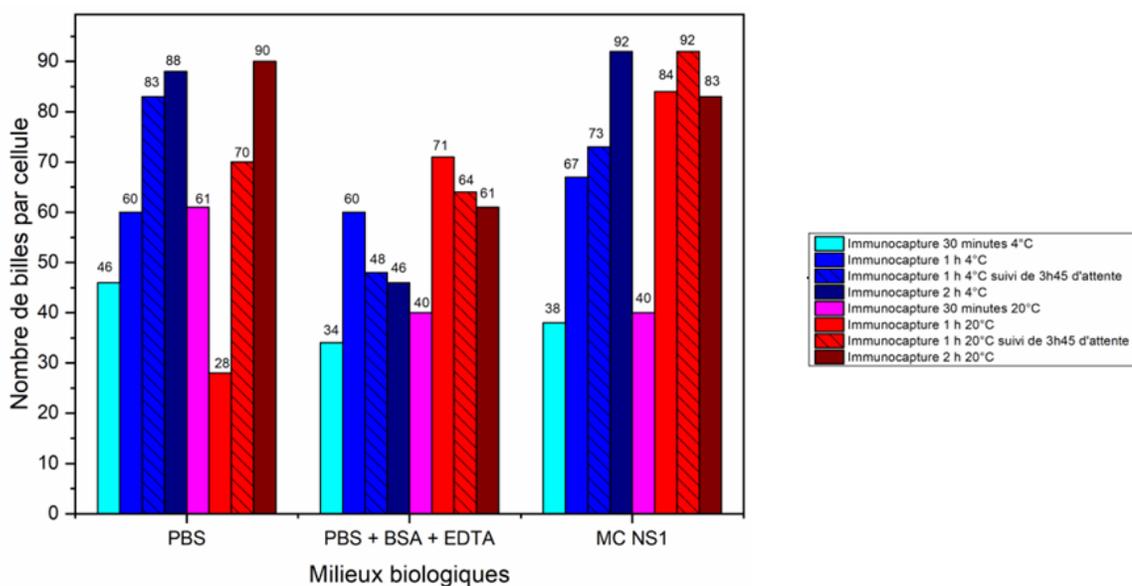


Fig. 3.6 - Effet de la température, de la durée d'immunocapture et de la complexification du milieu sur la labélisation des cellules NS1 par les billes magnétiques

Immunocapture de 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL au moyen de $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 : cinétique de 30 minutes, 1 h ou 2 h, à 4°C ou à 20°C, dans trois milieux différents : PBS, PBS + 0,5 % BSA + 2mM EDTA ou milieu de culture de cellules NS1 (composition dans le paragraphe 3.3.1.1)

3.4.1.2.2. Sérum de veau fœtal et plasma de lapin

Des essais en matrices complexes ont également été réalisés, notamment en sérum de veau fœtal décomplémenté et en plasma de lapin pur avec des immunocapture de 2 h à 20°C. Cependant, malgré une bonne labélisation, l'état d'agrégation des billes magnétiques fonctionnalisées n'est pas si satisfaisant comme observé sur la **Fig. 3.7** Il constitue le verrou principal de ces travaux et fait l'objet de recherche d'améliorations et d'optimisation (**paragraphe 3.4.2.3**).

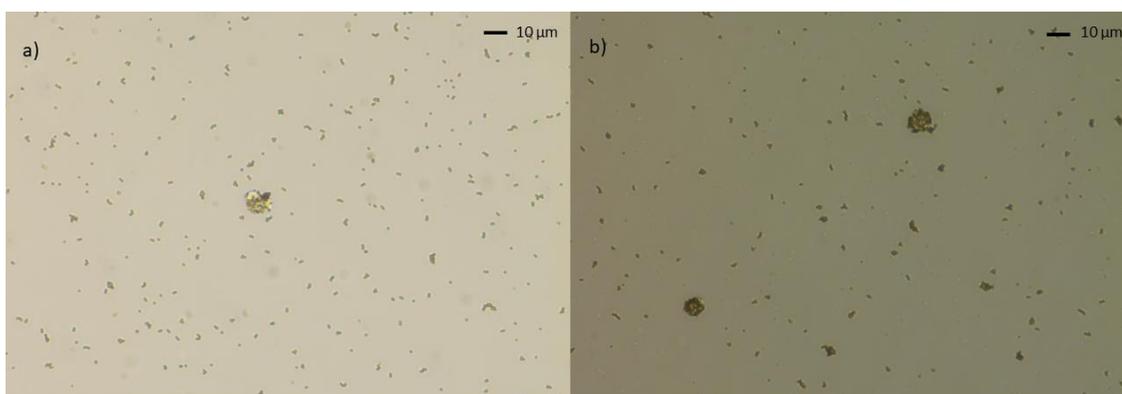


Fig. 3.7 - Labélisation des cellules NS1 dans du sérum de veau fœtal décomplémenté et dans du plasma de lapin pur

Labélisation de 10^3 cellules NS1 dans un volume de 1 mL après immunocapture de 2 h à 20°C par $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 a) dans du sérum de veau fœtal décomplémenté ou b) dans du plasma de lapin pur.

3.4.1.3. Choix des anticorps : labélisation et agrégation des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec différents anticorps anti-NS1

Les cellules ont à leur surface plusieurs marqueurs antigéniques différents, chacun d'entre eux pouvant être reconnu par des anticorps spécifiques. Nous avons donc souhaité évaluer les performances de différents anticorps spécifiques greffés en surface des billes pour immunocapturer les cellules NS1 dans le double objectif 1) d'améliorer leur labélisation magnétique (et donc la sensibilité de détection) et 2) de tenter de réduire le phénomène d'agrégation des billes magnétiques fonctionnalisées, principal facteur limitant pour la sensibilité et la spécificité de détection. Ces différents anticorps sont les suivants et ont été choisis sur la base de résultats de données d'expression de leur antigène à la surface des cellules NS1 [10] [11] :

- L'anticorps monoclonal de rat anti-CD138 murin utilisé jusqu'à présent, en témoin et pour comparaison. Le récepteur CD138, qui joue probablement un rôle dans les fonctions cellulaires, comme la prolifération, la mort programmée des cellules, la matrice cellulaire et l'adhésion entre les cellules, est décrit comme très fortement exprimé à la surface des cellules NS1 [11].
- L'anticorps monoclonal de rat anti-CD38 murin (clone 90), commercialement vendu par Invitrogen (référence 13-0381-85, sous une forme biotinylée et purifiée). Le récepteur CD38, qui est une glycoprotéine membranaire jouant un rôle dans la régulation de la migration et de l'adhérence des cellules, avec des fonctions de signalisation, est décrit comme moyennement bien exprimé à la surface des cellules NS1 [11].
- L'anticorps monoclonal de rat anti-CD184 murin (CXCR4) (clone 2B11), commercialement vendu par Invitrogen (référence 13-9991-82, sous une forme biotinylée et purifiée). Le marqueur CD184 est un récepteur transmembranaire à chimiokines, décrit comme faiblement exprimé à la surface des cellules NS1 [11].
- L'anticorps monoclonal de souris anti-CMHI (H-2K^d/H-2D^d) murin (clone 34-1-2S), commercialement vendu par Invitrogen (référence 13-5998-85, sous une forme biotinylée et purifiée). H-2K^d et H-2D^d sont des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type I et ont été démontrées comme exprimées à la surface des cellules NS1 [10].

Les anticorps biotinylés sont couplés aux billes magnétiques Dynabeads MyOne Streptavidin T1 comme détaillé précédemment dans le **paragraphe 3.2.2.4**. $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques couplées aux différents anticorps sont ensuite ajoutées respectivement à 10^5 cellules NS1 dans 1 mL final de milieu de culture (pour test spécifique), à 10^5 cellules CHO dans 1 mL final de milieu de culture (pour contrôle négatif), ou enfin à 1 mL de milieu de culture (sans cellule) pour le contrôle d'agrégation des billes.

Ensuite tous les échantillons sont incubés sous agitation 2 h afin que les billes magnétiques fonctionnalisées avec les différents anticorps puissent immunocapturer leurs cibles, les cellules NS1.

Nous avons testé individuellement les billes fonctionnalisées par chacun des quatre anticorps spécifiques, puis nous avons évalué les performances du mélange des 4 types de billes magnétiques fonctionnalisées.

Après les 2 h d'immunocapture, une vérification visuelle de la labélisation des échantillons est effectuée avec un microscope optique, grossissement 40X. Le marquage des cellules NS1 avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec les différents anticorps spécifiques est ainsi contrôlé au même titre que l'agrégation des billes magnétiques.

3.4.1.3.1. Anticorps anti-CD38

Contre toute attente, les anticorps anti-CD38 (attention, à ne pas confondre avec les anticorps anti-CD138 utilisés en routine au cours de ces trois années de thèse) ne semblent pas reconnaître les cellules NS1, puisqu'aucune labélisation n'est visible (**Fig. 3.8a**) contrairement aux résultats obtenus en cytométrie en flux par l'équipe de Rosa et al. [10]. Ces résultats sont toutefois concordants avec ceux d'Oliver et al. [11] montrant que le récepteur CD38 est sous-régulé dans les cellules plasmatiques murines, dont font partie les cellules NS1 (qui sont issues de lymphocytes B). D'autre part, de gros agrégats de billes sont visibles (**Fig. 3.8c**) et semblent plus conséquents que ceux présents avec les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 (**Fig. 3.2e**). La **Fig. 3.8** illustre parfaitement cette conclusion.

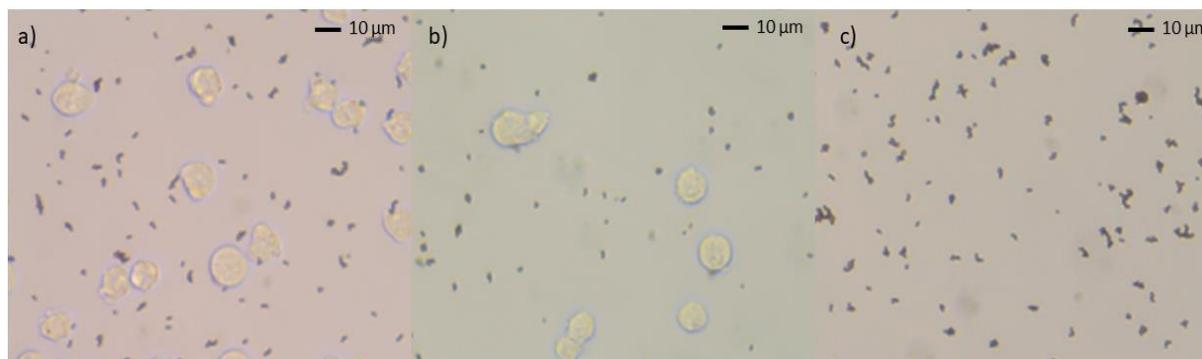


Fig. 3.8 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD38

$1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD38 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10^5 cellules CHO dans un volume final de 1 mL, ou c) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

3.4.1.3.2. Anticorps anti-CD184

Les anticorps anti-CD184 reconnaissent faiblement les cellules NS1, puisque la labélisation est faible voire inexistante, (**Fig. 3.9a**) conformément aux résultats obtenus par Rosa et al. [10]. D'autre part, les agrégats de billes semblent de taille similaire à ceux présents avec les billes fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 (**Fig. 3.9c**). La **Fig. 3.9** expose parfaitement ces résultats.

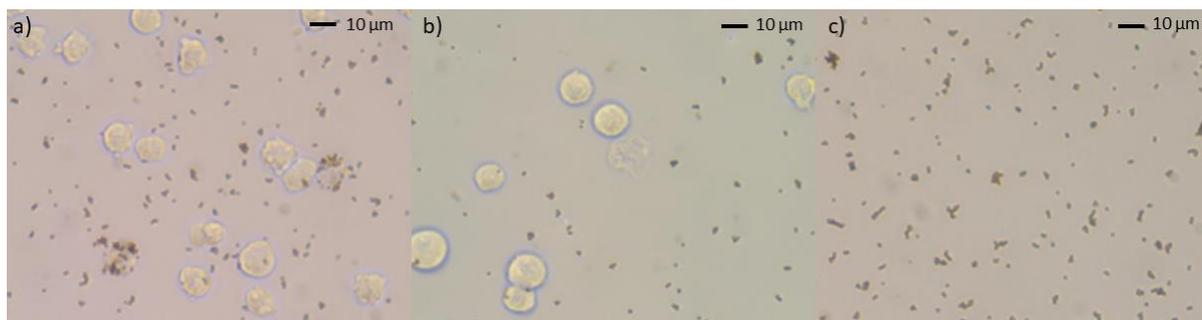


Fig. 3.9 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD184

$1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD184 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10^5 cellules CHO dans un volume final de 1 mL, ou c) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

3.4.1.3.3. Anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d

Les anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d reconnaissent faiblement les cellules NS1, puisqu'on observe quelques cellules labélisées (**Fig. 3.10a**), légèrement plus que pour l'anticorps anti-CD184 (**Fig. 3.9a**) mais cette labélisation est loin d'être suffisante. De plus, les agrégats semblent de taille plus importante comparé à ceux des billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 (**Fig. 3.10c**).

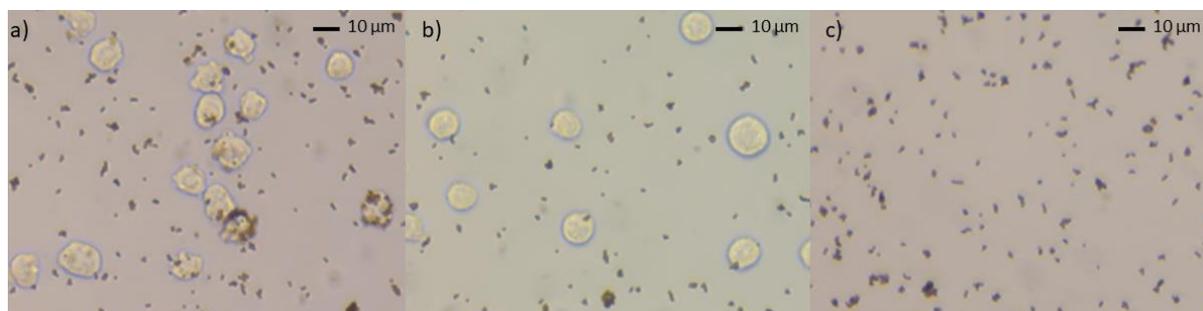


Fig. 3.10 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d

1,5 × 10⁷ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10⁵ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10⁵ cellules CHO dans un volume final de 1 mL, ou c) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

3.4.1.3.4. Mélange des quatre anticorps spécifiques aux cellules NS1

Enfin, nous avons évalué les performances du mélange des quatre types de billes magnétiques fonctionnalisées par chacun des quatre anticorps (anti-CD138, anti-CD38, anti-CD184 et anti-H-2K^d/H-2D^d), dans l'objectif d'accroître la labélisation des cellules NS1 et donc la sensibilité de détection.

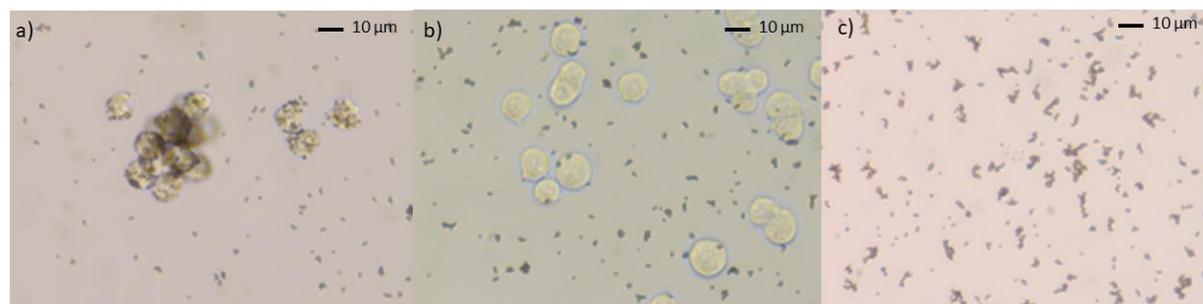


Fig. 3.11 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence d'un mélange de billes fonctionnalisées par les anticorps anti-CD138, anti-CD38, anti-CD184 et anti-H-2K^d/H-2D^d

1,5 × 10⁷ billes magnétiques Dynabeads MyOne totales, constituées de 3,75 × 10⁶ billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138, 3,75 × 10⁶ billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD38, 3,75 × 10⁶ billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD184 et 3,75 × 10⁶ billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-H-2K^d/H-2D^d ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10⁵ cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 10⁵ cellules CHO dans un volume final de 1 mL, ou c) en absence de cellules (billes magnétiques seules dans 1 mL de milieu de culture).

La labélisation est bien meilleure qu'avec les billes fonctionnalisées par chacun des anticorps anti-CD38, anti-CD184 et anti-H-2K^d/H-2D^d mais semble identique à la labélisation avec les anticorps anti-CD138 greffés seuls aux billes. L'intérêt du mélange semble donc limité, d'autant plus que les agrégats de billes sont assez conséquents pour les deux contrôles négatifs avec 10⁵ CHO/mL et les billes magnétiques seules couplées aux quatre différents anticorps (**Fig. 3.11b**) et (**Fig. 3.11c**). On peut noter que les agrégats de billes résiduels présents dans le milieu sont de tailles raisonnables pour le test spécifique avec 10⁵ NS1/mL (**Fig.**

3.11a), ce qui suggère une immunocapture préférentiellement réalisées par les agrégats de grosses tailles que par les billes isolées.

En conclusion, la labélisation est tout à fait honorable pour un mélange de billes fonctionnalisées par quatre anticorps différents spécifiques des cellules NS1, mais elle ne semble pas meilleure que pour les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 seul (cela resterait toutefois à confirmer plus précisément par exemple par microscopie MEBE comme décrit dans le [paragraphe 3.4.1.1](#)). De plus, l'agrégation semble plus importante avec ce mélange de billes pour les contrôles négatifs. Ainsi, il est préférable de continuer les expériences avec des billes fonctionnalisées uniquement avec l'anticorps anti-CD138 qui donne de meilleurs résultats et présente l'avantage de demander moins de préparation comme souhaité lors du développement d'un test de diagnostic facile d'utilisation.

3.4.1.4. Détermination de la concentration optimale en billes Dynabeads MyOne pour l'immunocapture des cellules NS1

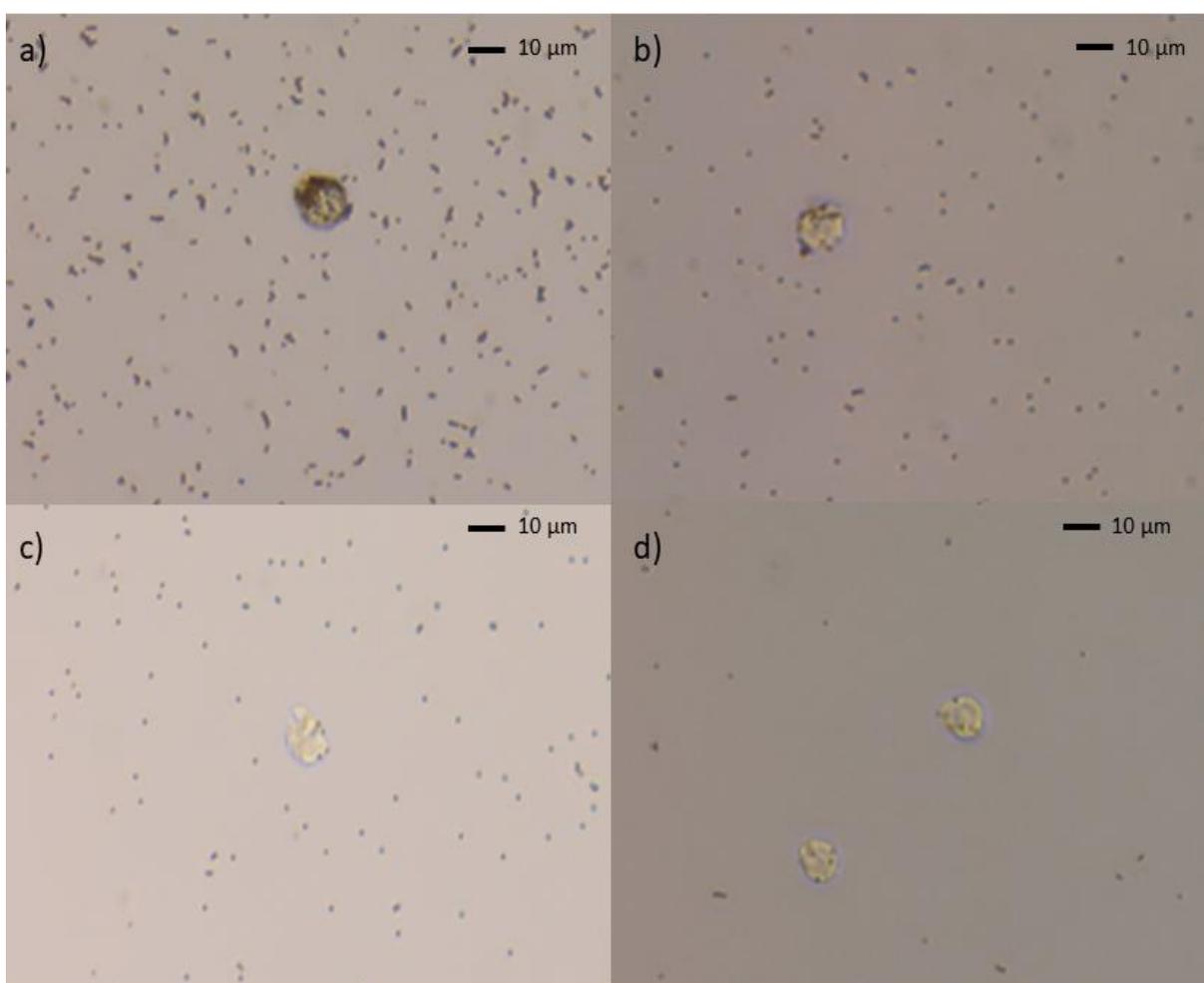


Fig. 3.12 - Labélisation de cellules NS1 avec différentes concentrations de billes magnétiques Dynabeads fonctionnalisées
 Une suspension de 10^3 cellules NS1/mL en milieu de culture a été incubée pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) $1,5 \times 10^7$ billes/mL, b) $7,5 \times 10^6$ billes/mL, c) 3×10^6 billes/mL ou d) $1,5 \times 10^6$ billes/mL pour des Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138. Au terme de ces 2 h d'immunocapture, des clichés photographiques ont été pris sous microscope optique (grossissement 40X) pour 100 µL de chacune des suspensions après 15 minutes de sédimentation. Les différents clichés présentés par concentration de billes sont issus d'expériences indépendantes, réalisées des jours différents.

Au cours de ses travaux de thèse [1], Manon Giraud avait déterminé que la concentration appropriée en billes Dynabeads MyOne était de $1,5 \times 10^7$ billes/mL pour assurer une immunocapture optimale de cellules NS1, tout en limitant l'agrégation, et ceci pour une gamme de concentration relativement élevée en NS1, i.e. de 10^3 à 10^5 cellules/mL en PBS.

Or, avec le développement du prototype de la deuxième biopuce GMR à deux étages qui permet une détection plus sensible, il est important de ré-évaluer la concentration de billes magnétiques à utiliser pour obtenir la meilleure immunocapture possible tout en limitant l'agrégation, sur une gamme de concentration plus faible en cellules NS1 qui est, de plus, réalisée dans une nouvelle solution (milieu de culture).

Nous avons donc réalisé des essais avec différentes concentrations de billes magnétiques fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 en présence de 10^3 NS1/mL dans du milieu de culture, comme illustré sur la **Fig. 3.12**.

Les expériences avec différentes concentrations de billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées montrent que la labélisation reste optimale pour $1,5 \times 10^7$ billes/mL (**Fig. 3.12a**). Toutefois, avec une concentration deux fois plus faible ($7,5 \times 10^6$ billes/mL) (**Fig. 3.12b**), la labélisation semble moindre mais correcte, avec des agrégats sensiblement moins nombreux et de plus petite taille (cela resterait toutefois à confirmer plus précisément par exemple par microscopie MEBE comme décrit dans le **paragraphe 3.4.1.1**). En revanche, en utilisant une concentration de 3×10^6 billes/mL, la labélisation est trop faible (**Fig. 3.12c**), et avec $1,5 \times 10^6$ billes/mL, elle semble quasi-inexistante (**Fig. 3.12d**).

En conclusion, pour les expériences suivantes réalisées tout au long de la thèse, nous avons choisi d'utiliser une concentration de billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées à $1,5 \times 10^7$ billes/mL, correspondant à $23 \mu\text{g/mL}$ de billes, en misant sur la capacité de la biopuce GMR à deux étages à distinguer les billes et petits agrégats des cellules NS1 magnétiquement marquées. Il pourrait être toutefois intéressant d'évaluer ultérieurement et comparer plus précisément l'effet de l'utilisation d'une concentration de billes deux fois plus faible sur le ratio signal/bruit (signaux spécifiques des cellules NS1 magnétiquement marquées enregistrés par le capteur GMR par rapport aux signaux non spécifiques dus aux gros agrégats de billes).

3.4.2. Réduction de l'état d'agrégation des billes magnétiques

Afin de limiter le nombre de faux positifs détectés par la biopuce GMR dus aux agrégats de billes magnétiques de grosses tailles, différents protocoles ont été évalués et comparés pour réduire au maximum l'agrégation des billes.

3.4.2.1. Sonication des billes magnétiques Dynabeads MyOne et Adembeads

Au cours de ses travaux de thèse [1], Manon Giraud a pu évaluer différentes méthodes physiques (sonication, vortex, filtration) et/ou chimiques (utilisation de différents détergents) pour tenter de dissocier les agrégats de billes Dynabeads tosylactivées fonctionnalisées (diamètre de $2,8 \mu\text{m}$) une fois ceux-ci formés. Aucun traitement efficace n'a pu être trouvé, hormis l'utilisation combinée de sonication/vortex et détergents (SDS ou Tween20) mais l'utilisation de ces derniers, même en très faible concentration (0,01 %), induit 100 % de mort cellulaire après immunocapture, rendant leur recours complexe voire impossible.

Nous avons envisagé, au cours de cette thèse, une autre alternative : celle de limiter la formation des agrégats eux-mêmes, par des cycles de sonication (dans un bain à ultrasons) réalisés précocement lors de la fonctionnalisation des billes (et juste avant utilisation), et aussi étudier la cinétique de l'état d'agrégation pour voir s'il existe une fenêtre d'utilisation des billes plus favorable. En effet, les billes magnétiques, sous leur forme commerciale et dans leur tampon de conservation, sont déjà agrégées (Fig. 3.13). Et la fonctionnalisation par les anticorps semble induire une agrégation supplémentaire.

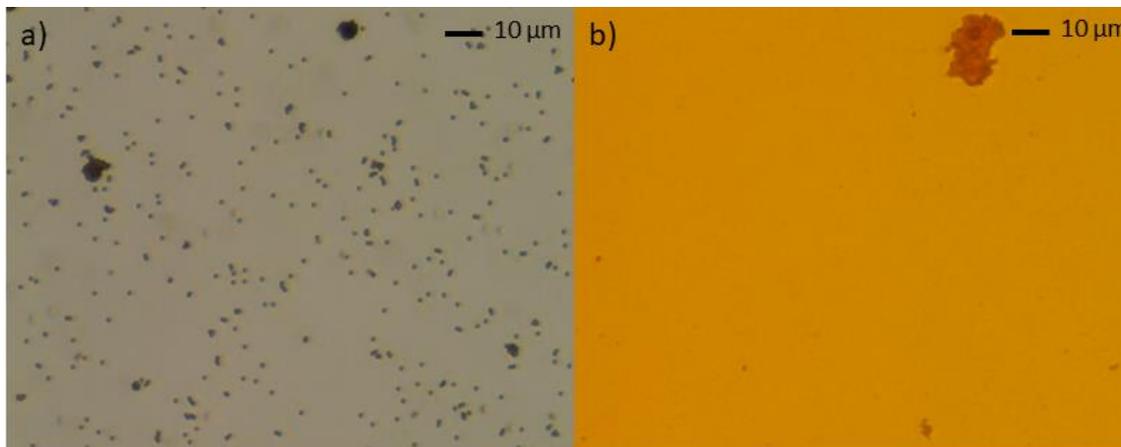


Fig. 3.13 - Deux types de billes sous leur forme commerciale (sans anticorps) dans du milieu de culture
 a) Billes Dynabeads MyOne de 1 µm et b) billes Adembeads de 200 nm.

D'autre part, nous souhaitons évaluer l'effet de la sonication sur les deux types de billes magnétiques utilisés lors de cette thèse : les billes Dynabeads MyOne (1 µm) Streptavidin fonctionnalisées et les billes Ademtech carboxyles (200 nm) fonctionnalisées. Nous avons donc testé un protocole de sonication (Fig. 3.14) avant fonctionnalisation et/ou juste avant utilisation des billes, que celles-ci soient utilisées extemporanément le jour même de la fonctionnalisation ou bien après 1,5 mois ou 3 mois de stockage à 4°C. L'état d'agrégation des billes a été doublement évalué 1) par observation au microscope optique et 2) par mesure sur la biopuce GMR à deux étages avec 3) contrôle de la capacité des billes à immunocapturer les cellules NS1.

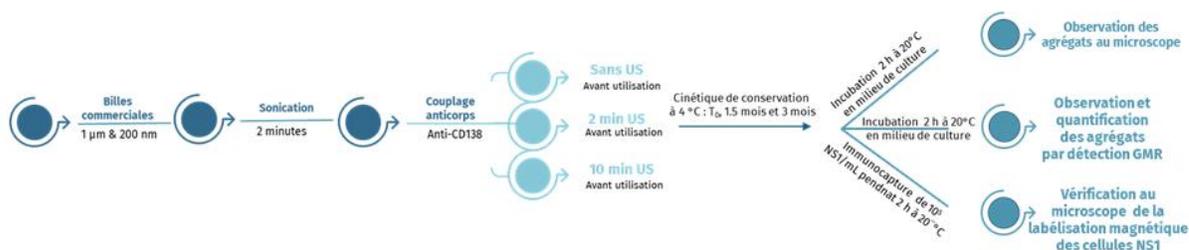


Fig. 3.14 - Protocole de la réduction de formation d'agrégats par sonication et de la cinétique de suivi des agrégats
 Protocole réalisé pour les billes magnétiques Dynabeads MyOne Streptavidin (1 µm) et les billes magnétiques Adembeads carboxyles (200 nm) fonctionnalisées chacune par les anticorps anti-CD138.
 US = ultrasons.

3.4.2.1.1. Sonication et cinétique de suivi des agrégats pour les billes magnétiques Dynabeads MyOne

Même si les agrégats de billes magnétiques Dynabeads MyOne 1 µm sont de taille relativement petite (Fig. 3.2), il reste toujours intéressant d'en diminuer le nombre et/ou la taille pour augmenter la sensibilité de détection par la biopuce GMR. Le Tableau 3.4 et la Fig. 3.15 ci-dessous présentent les résultats obtenus pour la cinétique de suivi des agrégats des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées et utilisées dans des conditions qui limitent la formation d'agrégats par sonication (protocole détaillé en Fig. 3.14).

Les résultats sont à la fois quantitatifs (dénombrement des agrégats détectables par le capteur GMR, Tableau 3.4) et qualitatifs (appréciation de la taille et du nombre des agrégats au microscope optique, Fig. 3.15 et Tableau 3.4) pour les agrégats présents dans les conditions réelles finales d'utilisation, i.e. après incubation de 2 h à température ambiante sous rotation en milieu de culture.

Tableau 3.4 - Cinétique qualitative et quantitative de l'état d'agrégation des billes magnétiques Dynabeads MyOne après fonctionnalisation et sonication

Le protocole expérimental est détaillé en Fig. 3.14. US = ultrasons

Incubation de 2 h à 20°C sans cellule	Observation au microscope			Détection GMR		
	Ø US	2 mn US	10 mn US	Ø US	2 mn US	10 mn US
Dynabeads MyOne 1 µm	Ø US	2 mn US	10 mn US	Ø US	2 mn US	10 mn US
Jour T₀ (jour de la fonctionnalisation)	Présence de nombreux agrégats mais de taille relativement petite (Fig. 3.15)			49 coïncidences	40 coïncidences	66 coïncidences
Après 1,5 mois de conservation à 4°C	Présence de nombreux agrégats mais de taille relativement petite (Fig. 3.15)			23 coïncidences	15 coïncidences	31 coïncidences
Après 3 mois de conservation à 4°C	Présence de nombreux agrégats mais de taille relativement petite (Fig. 3.15)			15 coïncidences	27 coïncidences	13 coïncidences

On remarque que les ultrasons n'ont pratiquement aucun effet sur le nombre de coïncidences, i.e. nombre d'agrégats de billes détectés par le capteur GMR, comme déjà observé par Manon Giraud avec les billes Dynabeads tosylactivées de 2.8 µm [1]. Cependant comme on peut le voir sur la Fig. 3.15 et le Tableau 3.4 ci-dessous, il semblerait qu'au cours du temps le nombre d'agrégats de billes diminue légèrement (tendance à une dissociation naturelle des agrégats ?). On peut également voir que les cellules sont toujours aussi bien labélisées magnétiquement.

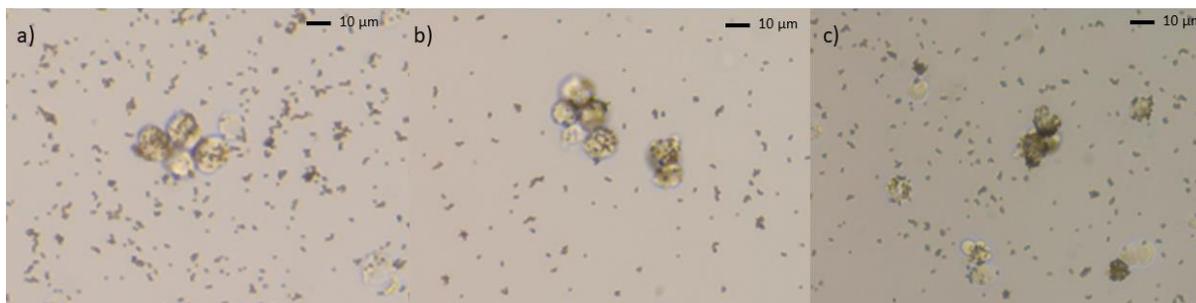


Fig. 3.15 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 au cours de leur cinétique de conservation

Une suspension contenant 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL en milieu de culture a été immunocapturée pendant 2 h à 20°C par $1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 avec sonication préalable de 10 minutes a) le jour de leur fonctionnalisation, b) après 1,5 mois de conservation à 4°C ou c) après 3 mois de conservation à 4°C.

3.4.2.1.2. Sonication et cinétique de suivi des agrégats pour les Adembeads carboxyles 200 nm

Contrairement aux billes Dynabeads MyOne, les billes Adembeads carboxyles 200 nm s'agrègent énormément (agrégats de très grosse taille) lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 (Fig. 3.4) qui est un anticorps monoclonal de rat (IgG2a). Sans savoir si cette différence de comportement est imputable à l'espèce d'origine de l'anticorps, cela démontre que l'anticorps utilisé pour la fonctionnalisation joue un rôle important, sinon majeur, dans l'agrégation des billes.

Il est impossible de réaliser des tests GMR avec les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138. En effet, les agrégats sont si gros (Fig. 3.16) que cela boucherait le canal microfluidique. Au vu de cet état d'agrégation déplorable à T_0 et après 1,5 mois de conservation à 4°C, nous avons jugé qu'il n'est pas nécessaire de réaliser des tests complémentaires après une conservation de 3 mois à 4°C des billes fonctionnalisées (Tableau 3.5).

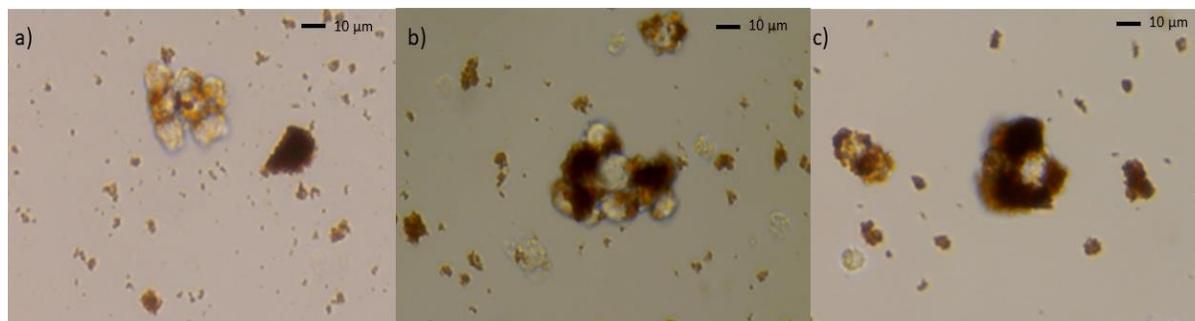


Fig. 3.16 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 au cours de leur cinétique de conservation

Une suspension contenant 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL en milieu de culture a été immunocapturée pendant 2 h à 20°C par 10^9 billes magnétiques Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 avec sonication préalable de 10 minutes a) le jour de leur fonctionnalisation, b) après 1,5 mois de conservation à 4°C ou c) après 3 mois de conservation à 4°C.

Les agrégats sont si gros que lorsque les cellules NS1 sont ajoutées à la solution de billes, il est impossible de vérifier si elles sont correctement labélisées ou s'il s'agit d'agrégats de billes (Fig. 3.16).

Tableau 3.5 - Cinétique qualitative et quantitative de l'état d'agrégation des billes magnétiques Adembeads carboxyles 200 nm après fonctionnalisation et sonication

Le protocole est détaillé en Fig. 3.14. US = ultrasons

Incubation de 2 h à 20°C sans cellule	Observation au microscope			Détection GMR		
	Ø US	2 min US	10 min US	Ø US	2 min US	10 min US
Adembeads 200 nm	Ø US	2 min US	10 min US	Ø US	2 min US	10 min US
Jour T ₀ (jour de fonctionnalisation)	Présence d'énormes agrégats (plus de 20 µm) (Fig. 3.16)			Non réalisé (agrégats de trop grosse taille, risque d'engorgement)		
Après 1,5 mois de conservation à 4°C	Présence d'énormes agrégats (plus de 20 µm) (Fig. 3.16)					
Après 3 mois de conservation à 4°C	Non réalisé (jugé inutile)					

3.4.2.1.3. Conclusion

Les ultrasons ne semblent pas être très utiles pour réduire l'agrégation des billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées. Une exposition prolongée aux ultrasons pourrait, en outre, déstructurer l'interaction entre la streptavidine en surface des billes et la biotine des anticorps en entraînant une dissociation (même si cette constante de dissociation est la plus forte connue, autour de 10⁻¹⁴ mol/L) ou bien dénaturer les anticorps. Si une telle situation se produisait, les cellules ne seraient plus labélisées correctement par les billes magnétiques.

Concernant les billes Adembeads 200 nm, la liaison de fonctionnalisation étant covalente, il y a peu de risque que les anticorps se décrochent des billes. Cependant, une fois encore, les ultrasons n'ont aucun effet sur les agrégats. Un espoir repose toutefois sur le choix des anticorps à utiliser pour la fonctionnalisation de ces billes puisque, d'un anticorps à un autre, l'état d'agrégation des billes fonctionnalisées est totalement différent (Fig. 3.17). Nous en parlerons davantage dans le chapitre 5 - lorsque nous utiliserons les billes Adembeads carboxyles 200 nm pour les premiers essais de détection des bactéries par le capteur GMR.

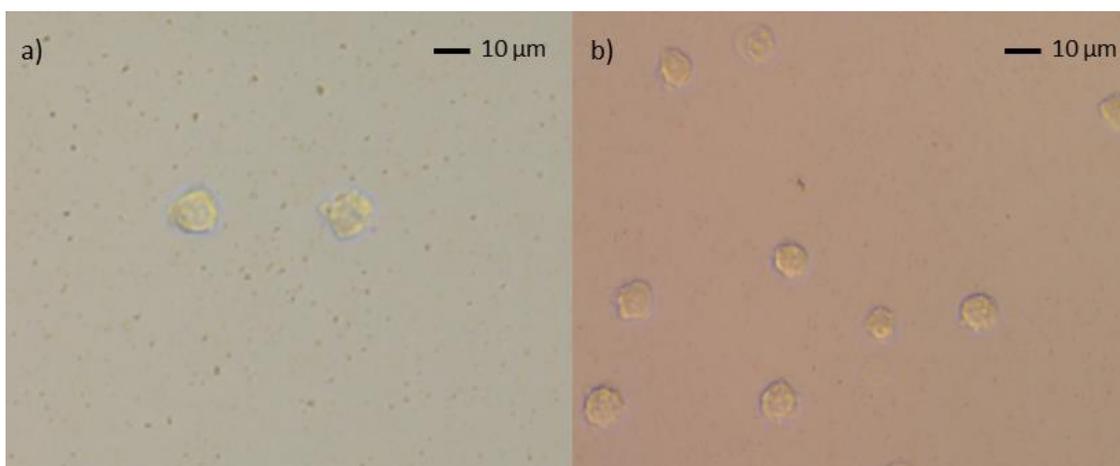


Fig. 3.17 - Illustrations photographiques (microscope optique) de l'incubation des cellules NS1 par les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées avec des anticorps non spécifiques aux cellules NS1

10^5 cellules NS1 dans 1 mL de volume final en présence de 10^9 billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec a) l'anticorps non spécifique Ipad315 et b) l'anticorps non spécifique MIP35.

3.4.2.2. Fragmentation $F(ab')_2$ à partir d'anticorps monoclonaux

Bien qu'étant en quête de protocole simple pour le développement de ce test de diagnostic, une autre solution a été envisagée pour tenter de limiter l'état d'agrégation des billes magnétiques qui semble augmenter avec leur fonctionnalisation. Il s'agit de fonctionnaliser les billes magnétiques avec un fragment d'anticorps, le fragment $F(ab')_2$ [12], qui est bivalent comme l'anticorps entier (i.e. possédant deux sites de reconnaissance de l'antigène) mais exempt de la majorité du fragment Fc (fragment cristallisable) (Fig. 3.18). Ainsi, on s'exempterait de l'agrégation induite par le fragment Fc [13], qui gouverne les fonctions effectrices des immunoglobulines reposant sur des mécanismes d'interactions diverses avec d'autres protéines/récepteurs ou avec lui-même (agrégation). En se dégageant de ces potentielles interactions non spécifiques médiées par le fragment Fc, les billes fonctionnalisées avec les fragments $F(ab')_2$ pourraient peut-être présenter une meilleure stabilité colloïdale. De plus, les fragments $F(ab')_2$ étant de plus petite taille (environ 110 kDa) que les anticorps entier (150 kDa), une fois couplés à la surface des billes, ils pourraient peut-être permettre une augmentation de la sensibilité de détection par effet de diminution de l'encombrement stérique.

En pratique, la région charnière des anticorps (zone reliant les deux Fab (fragment antigen binding) au fragment Fc) est facilement accessible par des enzymes. L'attaque protéolytique en ce point permet l'obtention, d'une part, des fragments $F(ab')_2$ ou Fab' (ou Fab) et, d'autre part, du fragment Fc. Il en résulte un fragment Fc intact ou bien digéré en courts peptides, en fonction de l'enzyme et des conditions utilisées.

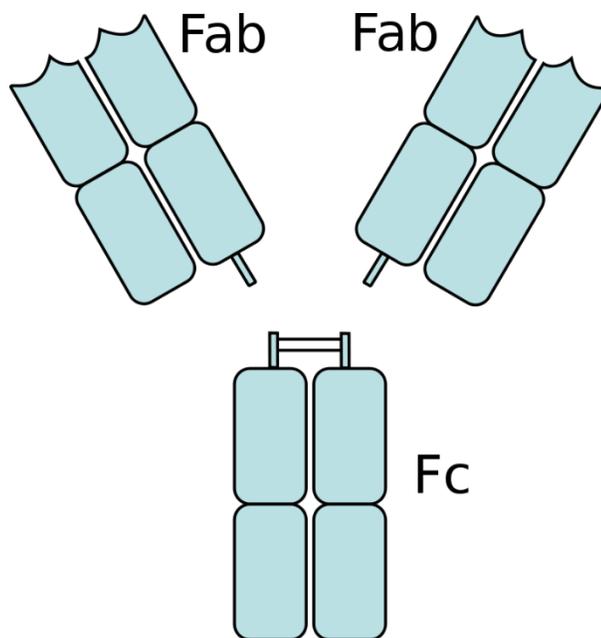


Fig. 3.18 - Schéma d'un anticorps

Anticorps composé de deux régions variables appelées F(ab) et d'une partie constante appelée Fc. [Wikipédia]

3.4.2.2.1. Utilisation d'un anticorps témoin

Pour réaliser une fragmentation $F(ab')_2$ à partir d'un anticorps entier, des quantités importantes d'anticorps sont initialement requises pour en valoir la peine en termes de rendement. Or, l'anticorps anti-CD138 étant un anticorps commercial, sa disponibilité en grande quantité n'est pas aussi aisée que celle d'anticorps monoclonaux produits au LERI.

Nous avons donc choisi d'utiliser un autre anticorps, de même isotype que l'anticorps anti-CD138, et qui induise une forte agrégation des billes magnétiques une fois celui-ci greffé à leur surface. L'anticorps IpaD315 répond à tous ces critères (Fig. 3.19).

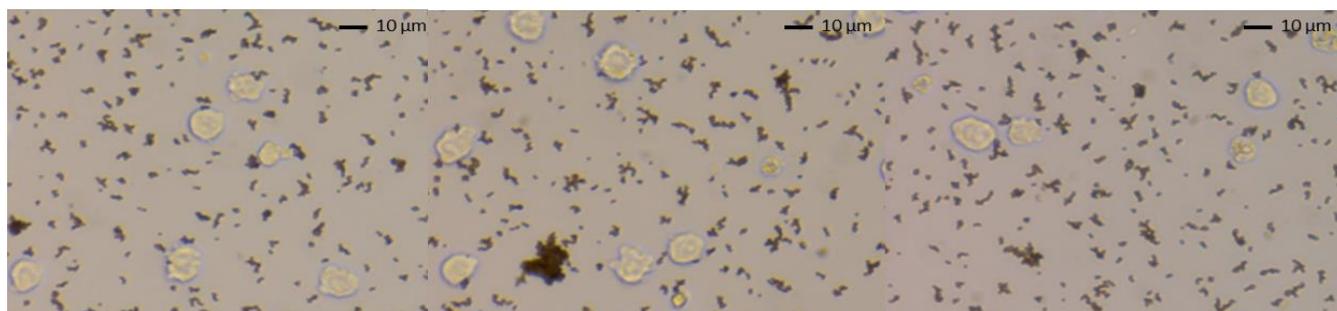


Fig. 3.19 - Illustrations photographiques (microscope optique) d'échantillons biologiques en présence de billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps IpaD315

$1,5 \times 10^7$ billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps IpaD315 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL de milieu de culture. Les cellules NS1 ne sont pas labélisées puisque l'antigène reconnu par l'anticorps IpaD315 n'est pas exprimé en surface des cellules NS1. Les agrégats de billes magnétiques sont très nombreux et de taille conséquente, ce qui fait de l'anticorps IpaD315 un bon candidat de travail à la recherche de piste de réduction de l'agrégation des billes par fragmentation $F(ab')_2$ des anticorps.

L'anticorps IpaD315 [9] [14] est un anticorps monoclonal de souris, de même isotype que l'anticorps anti-CD138 (IgG2a), qui reconnaît un antigène bactérien présent chez *Salmonelle* et *Shigelle* mais non exprimé par les cellules NS1. Il est produit au LERI contrairement à l'anticorps anti-CD138. C'est pourquoi, pour des raisons de coût, la fragmentation est réalisée sur l'anticorps IpaD315 et non sur l'anticorps anti-CD138.

3.4.2.2.2. Fragmentation F(ab')₂ par digestion pepsique en milieu acide

La pepsine est une endopeptidase non-spécifique qui est active uniquement à pH acide [15]. Elle est inactivée irréversiblement à pH neutre ou alcalin. L'attaque protéolytique de l'anticorps par cette enzyme digère le fragment F_C en de nombreux petits peptides en libérant le fragment F(ab')₂ constitué des deux fragments Fab' reliés par un pont disulfure (Fig. 3.20). Le F(ab')₂ est ensuite aisément purifiable par dialyse, chromatographie d'exclusion ou chromatographie d'échange d'ions pour éliminer les courts peptides du fragment F_C.

Traditionnellement, la pepsinolyse est réalisée en solution en utilisant une enzyme libre. Mais, ici, nous avons utilisé un kit Pierce commercial (annexe G - 7.7) dans lequel la pepsine est immobilisée sur la résine d'une colonne. L'utilisation de ce kit est simple, permet un meilleur contrôle de la digestion (d'après le fabricant) et une séparation facile de l'enzyme et du digestat. Cette fragmentation en milieu acide se réalise en trois étapes (Fig. 3.20) :

- La pepsinolyse, réalisée par incubation sous agitation permanente à 37°C, pendant laquelle la pepsine va digérer la partie F_C des anticorps. Il est important de stopper la protéolyse au bon moment (par choc basique ou séparation physique) pour libérer les fragments F(ab')₂ sans les dégrader, d'où l'importance de réaliser une cinétique (même si un abaque est disponible dans le kit Pierce en fonction de l'espèce et de l'isotype de l'anticorps). Au terme de cette incubation, le digestat est récupéré par centrifugation de la colonne.
- La purification du digestat par élimination des anticorps entiers non digérés. Cette étape est réalisée par chromatographie d'affinité au moyen d'une colonne de protéine A. La protéine A est une protéine de 40-60 kDa produite par la bactérie *Staphylococcus aureus* et qui présente une forte affinité pour le fragment F_C des anticorps. La colonne de protéine A va donc retenir les anticorps entiers non protéolysés et la fraction non retenue sur la colonne, contenant les F(ab')₂ et les petits peptides digérés du fragment F_C, est collectée et récupérée. A noter qu'il est possible d'éluer et récupérer les anticorps entiers si la pepsinolyse n'a pas fonctionné.
- La purification des F(ab')₂ par dialyse (possible aussi par chromatographie d'exclusion ou d'échanges d'ions). La dialyse est une technique de séparation par diffusion au travers d'une membrane poreuse dans une solution liquide. C'est la taille des pores qui définit le seuil de séparation. Ici, nous avons utilisé des membranes présentant un seuil de coupure de 10 kDa, laissant passer les petits fragments de F_C qui seront dilués dans le grand volume du bain de dialyse (5 L de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4) alors que les fragments F(ab')₂ resteront confinés à l'intérieur du boudin (membrane) de dialyse pendant toute la durée de cette séparation (12 h à 4°C).

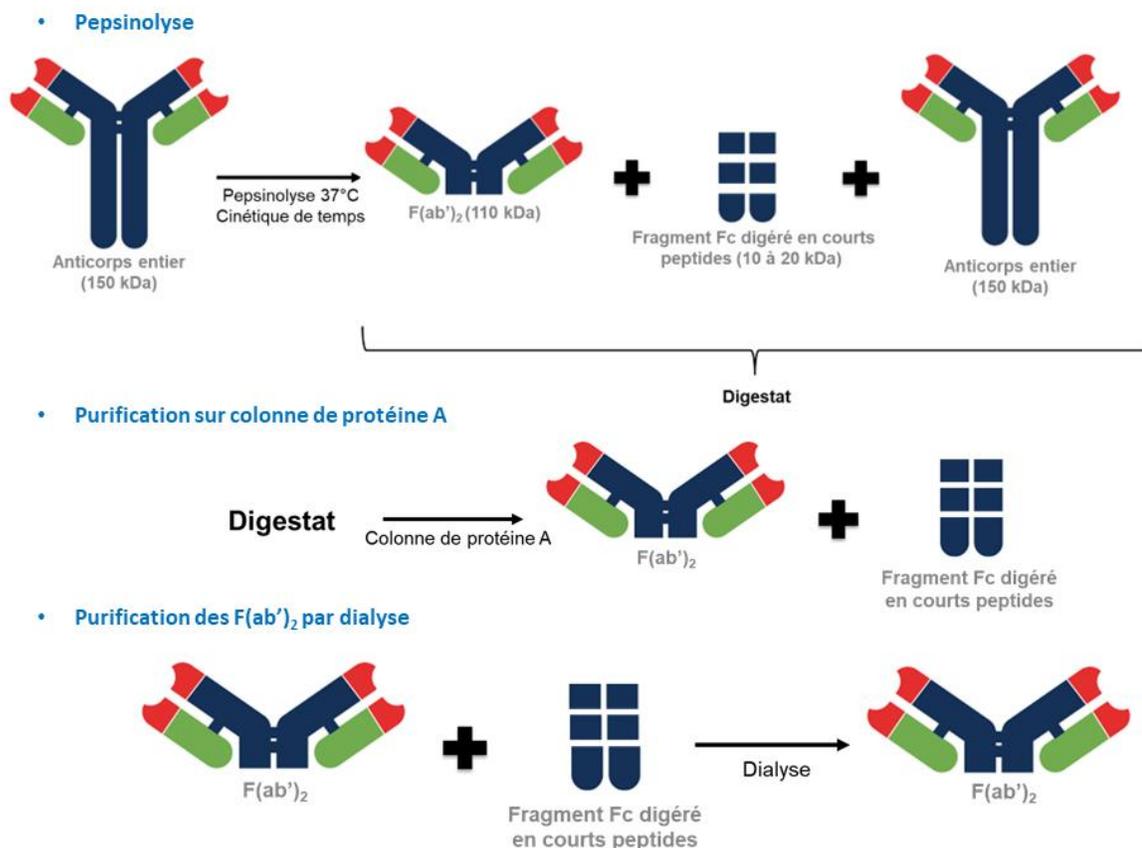


Fig. 3.20 - Protocole de fragmentation F(ab')₂ par digestion pepsique en milieu acide

Dans un premier temps, une pepsinolyse de 2 h 30 (durée conseillée par le fabricant pour la solution d'anticorps murin (IpaD315) à 2,5 mg/mL dont nous disposons) a été réalisée mais s'est avérée trop longue (anticorps probablement dégradé par l'exposition excessive à la pepsine). Aussi une cinétique de pepsinolyse a été mise en place avec des temps de protéolyse de 30 minutes, 1 h et 1 h 45.

Puis, les échantillons obtenus aux différentes étapes (anticorps entier de départ, digestats après pepsinolyse, fractions purifiées après colonne de protéine A et après dialyse) sont analysés par électrophorèse capillaire en gel sur le bioanalyseur Agilent 2100 ([annexe H - 7.8](#)). Cette technique permet de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des molécules en fonction de leur charge et, pour des charges identiques (ce qui est le cas ici), en fonction de leur taille dont dépendent leur mobilité dans le gel (les petites protéines vont migrer plus rapidement que les grosses).

L'électrophorèse capillaire est beaucoup plus facile d'utilisation (automatisée, miniaturisée avec laboratoire sur puce à usage unique) et plus rapide que l'électrophorèse classique. Grâce au logiciel d'analyse fourni avec l'appareil, il est très simple d'accéder à la pureté de la protéine (pourcentage de l'intensité de la bande d'intérêt par rapport à l'intensité moyenne du bruit de fond présent sur l'électrophorégramme).

En observant l'électrophorégramme (Fig. 3.21), nous pouvons constater que l'anticorps IpaD315 supporte mal une conservation en pH acide, puisque dès le départ (ligne 1), la grande majorité (75 %) se dégrade en petits fragments de 15 kDa (50 %) et 23 kDa (25 %), et seule une minorité de l'anticorps reste intacte (20 % à 170 kDa). Après pepsinolyse, de légères traces sont visibles à 110 kDa (poids moléculaire attendu pour les F(ab')₂) pour une protéolyse de 30 minutes et 1 h mais le rendement est bien faible (0,6 %), le reste étant dégradé (98 % présente une taille < 23 kDa). Au-delà d'une heure de pepsinolyse, l'anticorps est dégradé à 99 %. Les concentrations mesurées en F(ab')₂ purifiés après dialyse (non visible sur électrophorèse) sont de quelques µg/mL, ce qui est inutilisable. En conclusion, l'anticorps IpaD315 ne semble pas supporter le choc acide (pH = 3) requis pour l'activation de la pepsine.

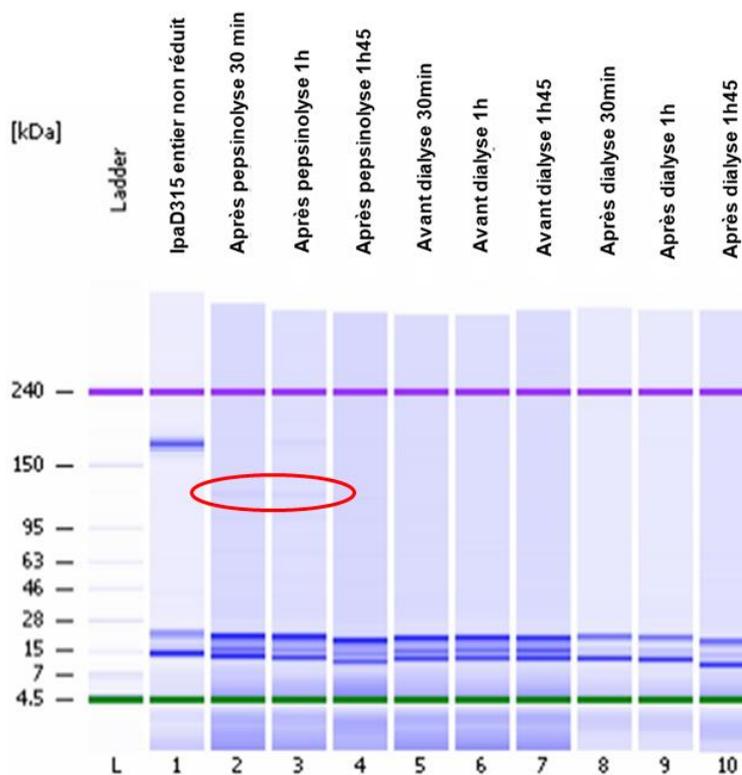


Fig. 3.21 - Electrophorégramme de contrôle de la fragmentation de l'anticorps IpaD315 par digestion pepsique

- 1 - Anticorps IpaD315 entier de départ (pH=3) juste avant pepsinolyse.
- 2, 3, 4 - Digestats après pepsinolyse 30 minutes, 1h ou 1h45 respectivement.
- 5, 6, 7 - Digestats après purification par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A et avant dialyse.
- 8, 9, 10 - Fractions purifiées en F(ab')₂ après dialyse.

3.4.2.2.3. Fragmentation F(ab')₂ par ficinolyse en milieu neutre

Au vu des résultats obtenus pour la fragmentation des anticorps en milieu acide, il a été envisagé de réaliser une fragmentation en milieu neutre en utilisant une autre enzyme, la ficine fonctionnant à pH = 7,4 [16]. Les étapes d'obtention des F(ab')₂ par ficinolyse à partir des anticorps entiers sont détaillées dans la Fig. 3.22.

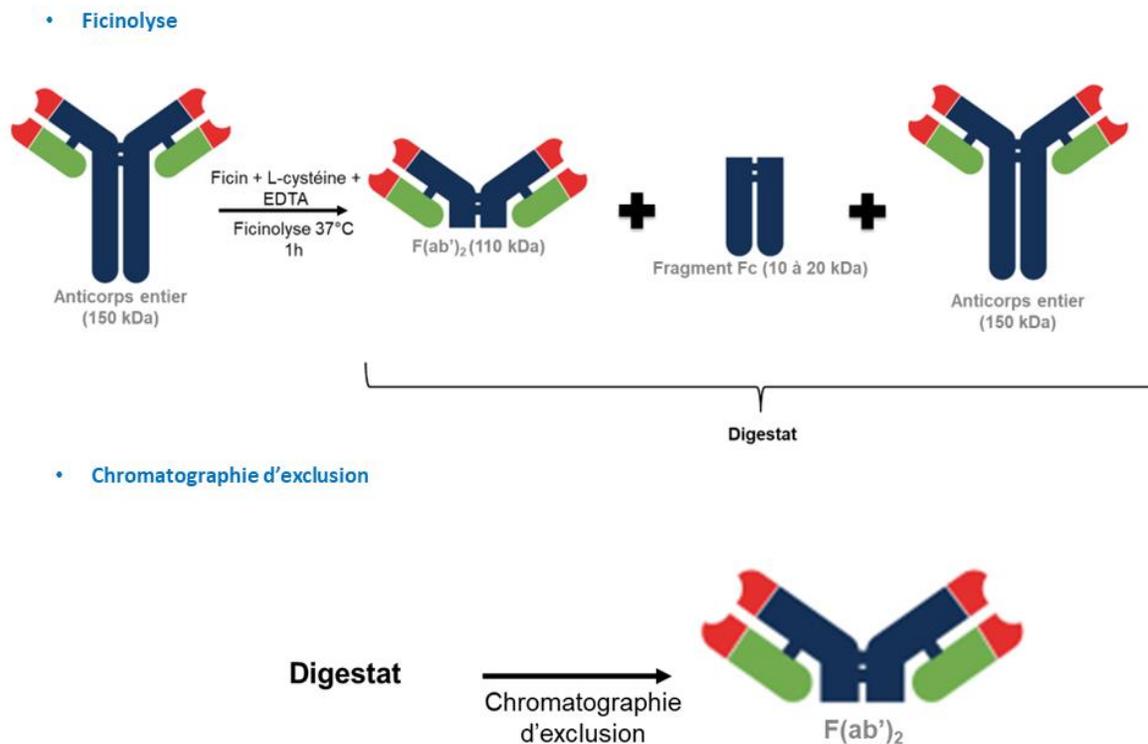


Fig. 3.22 - Protocole de fragmentation F(ab')₂ par ficinolyse en milieu basique

La ficine est une enzyme thiol-dépendante, dont l'activation requiert la présence (200 mM) de L-cystéine (acide aminé contenant une fonction thiol). Afin de prévenir l'oxydation des thiols, de l'EDTA 400 mM est ajouté dans le mélange réactionnel ; c'est en effet un chélateur de métaux (antioxydant). Pour stopper la réaction de ficinolyse, du NEM (N-éthylmaleimide) 0,1 M est ajouté pour former des liaisons de thioéther covalentes stables avec les sulfhydryles (thiols) et ainsi bloquer irréversiblement la L-cystéine réduite, qui ne permettra donc plus à la ficine de fonctionner. Ensuite, une chromatographie d'exclusion sur colonne ACA44 est réalisée afin de séparer les protéines contenues dans le digestat selon leur taille [17] en éluant en 50 fractions de 1 mL. Les plus grosses protéines (i.e. anticorps entiers (150 kDa), suivis de très près par les F(ab')₂ (110 kDa), pics indissociables sur la Fig. 3.23A) sont élués les premières, puis les plus petites protéines, tels que le Fc (50 kDa) et la ficine (25 kDa), en terminant par les molécules de plus faible poids moléculaire (L-cystéine bloquée par le NEM, 245 Da (Fig. 3.23A) et, pour une meilleure résolution et séparation des pics, voir [17]).

L'absorbance à 280 nm de chaque fraction éluée (**Fig. 3.23A**) est mesurée sur un spectrophotomètre (cette absorbance est proportionnelle à la quantité d'acides aminés aromatiques (Tryptophane et Tyrosine) et résidus cystéines présents dans la protéine ou dans la solution, et donc proportionnelle à la concentration en protéine, i.e. $F(ab')_2$ et anticorps entiers non digérés s'il en reste). Grâce à l'équation de Beer-Lambert (**Eq. 3.1**), la concentration protéique après ficinolyse et purification est estimée à 0,5 mg/mL (pour 3 mL collectés dans le premier pic de la **Fig. 3.23A**).

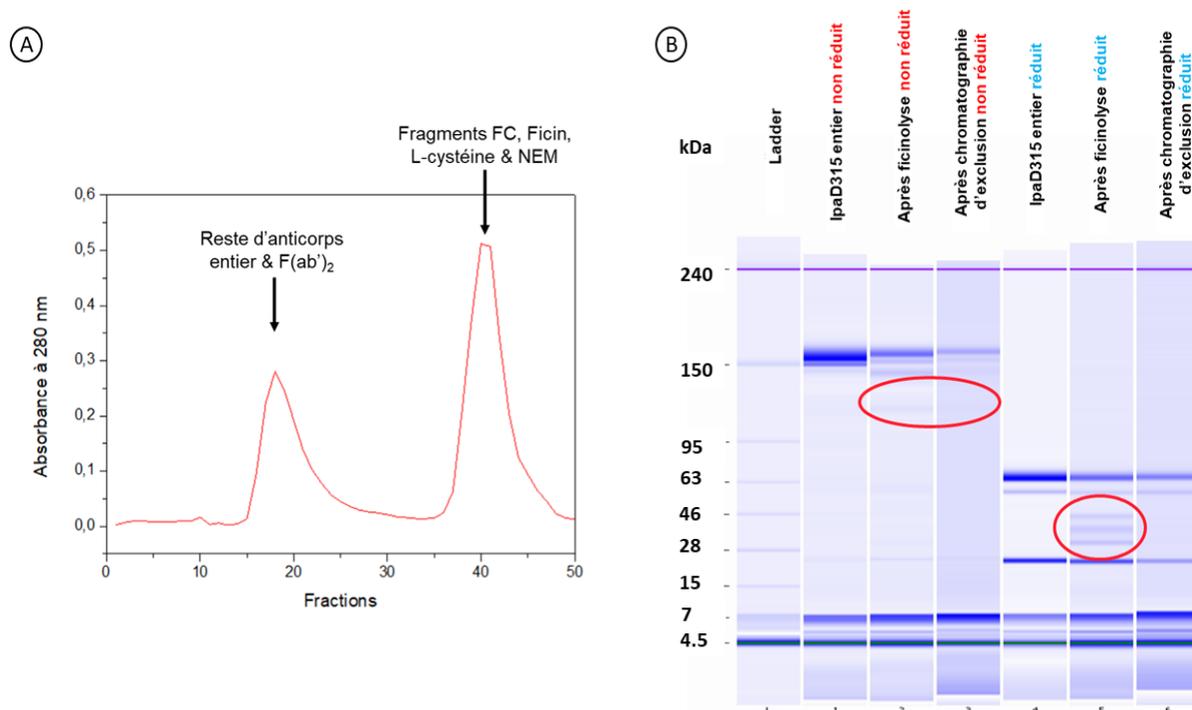


Fig. 3.23 - Résultat de la tentative de production de $F(ab')_2$ IpaD315 par ficinolyse

A) Profil d'élution en sortie de la chromatographie d'exclusion. B) Electrophorégramme de contrôle de la fragmentation de l'anticorps IpaD315 par ficinolyse.

Comme au départ, nous avons 3,246 mg d'anticorps entier IpaD315, cela correspond à un rendement de 50 %.

Enfin, les échantillons obtenus aux différentes étapes (anticorps entier de départ, après ficinolyse et après purification) sont analysés par électrophorèse capillaire sur le bioanalyseur Agilent 2100 pour identifier la nature des composés protéiques présents dans chaque fraction (**Fig. 3.23B**). La solution mère d'anticorps entier IpaD315 est pure à 97 % (bande autour de 155 kDa en conditions non réductrices) et se réduit bien en chaînes lourdes (66 kDa) et chaînes légères (24 kDa) en conditions réductrices (i.e. en présence de β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures des anticorps). Après ficinolyse puis purification sur chromatographie d'exclusion, on obtient un rendement stable mais déplorable d'environ 3 % de $F(ab')_2$ contre environ 90 % d'anticorps entier non digéré. Nous n'avons pas d'explication pour les 3 bandes visibles après ficinolyse et avant purification de 28 à 46 kDa en conditions réductrices.

En conclusion, la ficinolyse n'a pas bien fonctionné et nous suspectons que la solution de ficine utilisée soit dégradée (par péremption). Mais nous avons décidé de ne pas poursuivre dans cette voie, au vu des difficultés rencontrées et du temps passé pour ces longues manipulations. Nous restons toutefois convaincus que cela reste une possibilité à explorer pour réduire l'état d'agrégation des billes fonctionnalisées.

3.4.2.3. Fabrication de nouvelles billes magnétiques à forte stabilité colloïdale¹⁴

Comme énoncé en début de chapitre, une nouvelle collaboration a débuté avec le Laboratoire d'Innovation pour les Technologies des Energies nouvelles et des Nanomatériaux (LITEN, CEA Grenoble). Ce laboratoire est spécialisé dans la fabrication de petites billes à grande stabilité colloïdale (avec dispersion optimale des billes en solution). Un brevet (n° FR2207815) a été déposé le 28 juillet 2022.

L'objectif de cette collaboration est d'obtenir des nanoparticules magnétiques monodisperses afin de s'affranchir du problème d'agrégation qui survient dans la plupart des nanoparticules magnétiques commerciales. Cette stabilité colloïdale est un véritable défi pour notre projet. En effet, la présence d'agrégats de particules magnétiques est à l'origine de faux positifs qui limitent la sensibilité et la spécificité de la détection par la biopuce GMR à deux étages.

Pour l'ensemble des lots de billes produits par le LITEN, l'état d'agrégation en milieu de culture a été observé. D'autre part, tous les lots de billes carboxyles produits ont été évalués, à réception au LERI et après fonctionnalisation par l'anticorps anti-CD138, pour leur capacité à immunocapturer en 2 h à 20°C les cellules NS1 (10⁵ cellules NS1/mL).

3.4.2.3.1. Caractéristiques magnétiques des billes du LITEN

Plusieurs billes ont été conçues par le LITEN spécifiquement pour ce projet. Trois cœurs magnétiques en nickel, ferrite-PVA (alcool polyvinylique) et ferrite-PVP (polyvinylpyrrolidone) (le PVA et le PVP sont des stabilisants et agents de dispersion) ainsi que les mêmes cœurs magnétiques enrobés d'une couche de 50 nm de SiO₂ ont été synthétisés et caractérisés magnétiquement. Les résultats de ces mesures se trouvent dans le [Tableau 3.6](#) et sur la [Fig. 3.24](#).

Tableau 3.6 - Caractéristiques magnétiques des billes artisanales synthétisées au LITEN

Billes magnétiques	Ni	Ni-SiO ₂	Fe ₃ O ₄ -PVA	Fe ₃ O ₄ -PVA-SiO ₂	Fe ₃ O ₄ -PVP	Fe ₃ O ₄ -PVP-SiO ₂
Diamètre	250 nm	300 nm	300 nm	350 nm	300 nm	350 nm
Moment magnétique à saturation (emu/bille)	3,52 × 10 ⁻¹²	3,42 × 10 ⁻¹²	2,94 × 10 ⁻¹²	4,63 × 10 ⁻¹²	2,88 × 10 ⁻¹²	3,81 × 10 ⁻¹²
Moment magnétique à 900 G (emu/bille)	2,76 × 10 ⁻¹²	2,52 × 10 ⁻¹²	1,95 × 10 ⁻¹²	2,82 × 10 ⁻¹²	1,67 × 10 ⁻¹²	2,16 × 10 ⁻¹²

Les billes à base de nickel sont composées d'un cœur unique et ont un comportement plutôt ferromagnétique tandis que les billes en ferrite sont composées d'une multitude de cœurs et ont des propriétés superparamagnétiques. Nous avons donc décidé d'exclure dans un premier temps les billes avec un cœur en nickel afin de rester proche des conditions des billes commerciales.

Concernant les billes en PVA et PVP, le moment magnétique est plus élevé pour les billes ferrite + PVA.

¹⁴ Ces nouvelles billes magnétiques sont fabriquées par Olivier Poncelet et Antonin Duret à Grenoble. Ensuite, une fois réceptionnées au LERI, j'évalue leur capacité à labéliser les cellules NS1 et j'observe leur état d'agrégation en milieu de culture.

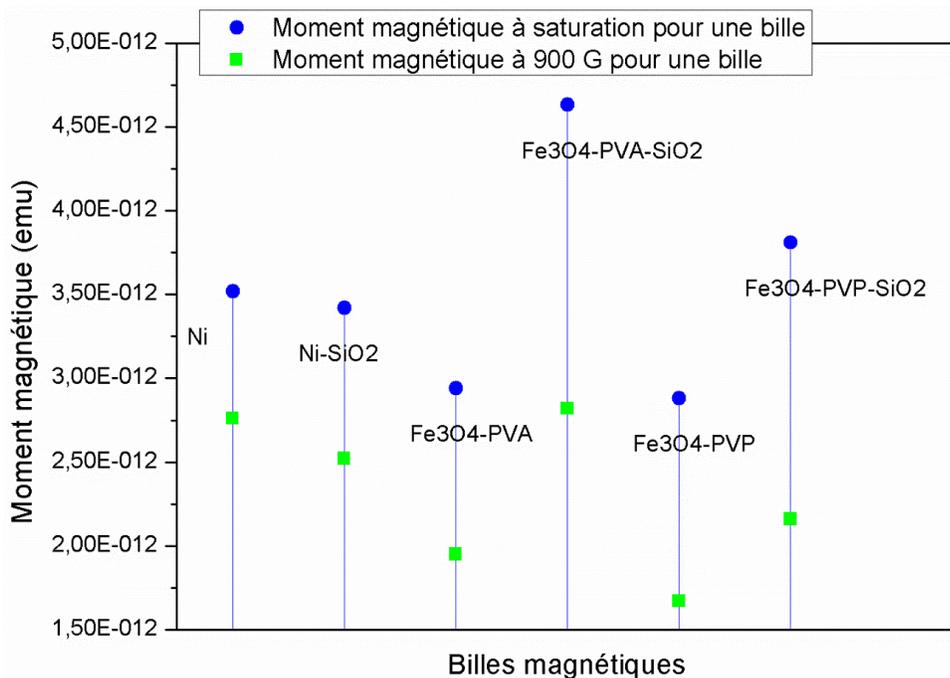


Fig. 3.24 - Graphique des moments magnétiques à saturation ou à 900 G en fonction du type de billes magnétiques

3.4.2.3.2. Potentiel Zêta

Ces billes magnétiques ont toutes été caractérisées par zétamétrie et imagerie MEB. Puis, une étude systématique a été réalisée en les associant aux anticorps monoclonaux en milieu de culture.

Une particule en suspension est entourée d'un nuage d'ions ainsi elle acquiert une charge électrique qu'on appelle potentiel Zêta [18] [19]. Ainsi ce potentiel permet de mesurer l'intensité de répulsion ou d'attraction entre les charges électriques des différentes particules. Sa mesure apporte donc une compréhension des causes de dispersion et d'agrégation. Lorsque le potentiel Zêta tend vers zéro, les forces inter-particulaires diminuent et les forces attractives deviennent prépondérantes entraînant l'agrégation des particules. Pour obtenir une suspension stable, l'objectif est donc d'obtenir le potentiel Zêta le plus élevé en valeur absolue possible. Cependant dans le cadre du test, il est nécessaire que ce dernier ne soit pas trop éloigné du zéro afin de ne pas perturber l'équilibre des milieux biologiques utilisés.

Les paramètres qui influencent la charge de surface des particules et donc le potentiel Zêta sont le pH du milieu utilisé, sa conductivité ainsi que sa concentration ionique (et notamment en sels).

3.4.2.3.3. Synthèse des billes Fe₃O₄ - PVA

Les billes ainsi choisies sont toutes composées des éléments de base suivants (Fig. 3.25) : ferrite, PVA et silice [20].

Afin de synthétiser ces billes, 1 g de PVA est ajouté à 100 mL d'eau dé-ionisée (DI). Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 1 heure jusqu'à dissolution complète du PVA. La solution est limpide et incolore. Ensuite, la température redescend à 50°C puis 4,065 g de FeCl₃, 6H₂O sont ajoutés. La dissolution est totale et la solution est rouge translucide.

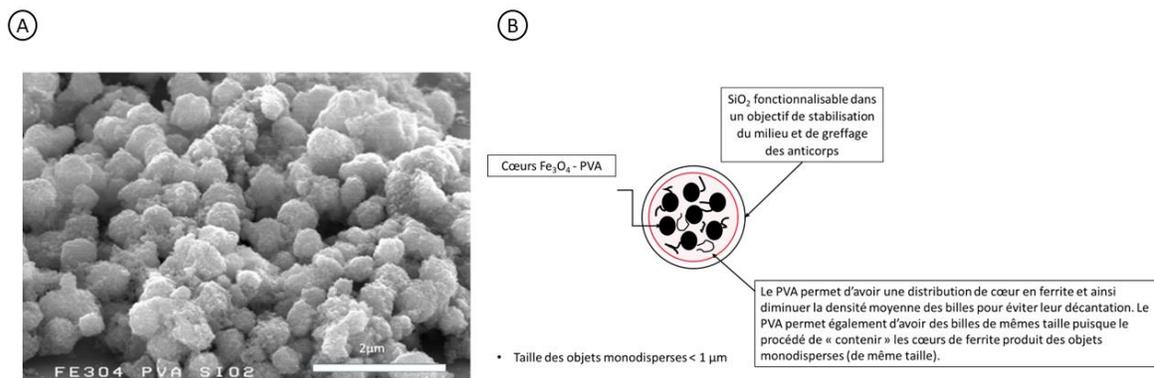


Fig. 3.25 - A) Image MEB des billes magnétiques Fe₃O₄-PVA-SiO₂ qui permet de mettre en évidence la monodispersité en taille de particules composites obtenues. B) Détails de la composition des billes magnétiques Fe₃O₄-PVA-SiO₂

Parallèlement dans un autre récipient, 150 mL d'eau DI, 8,82 g de citrate de sodium 2H₂O et 2,7 g d'urée sont mélangés.

Les deux solutions sont ensuite mélangées à température ambiante pendant 10 minutes, la couleur du mélange est orange et le milieu trouble. La suspension est ensuite versée dans un autoclave chemisé téflon et 50 mL d'eau DI est ajouté. Puis l'autoclave est chauffé à 200°C pour une durée de 24 h. Après ces 24 h, l'autoclave refroidit et une suspension noire est observée. Le précipité est récupéré par centrifugation et celui-ci est lavé trois fois à l'eau DI, chaque lavage étant suivi d'un cycle de centrifugation.

2,2 g environ de matière sèche (une nuit à 100°C en étuve ventilée) est récupéré. La poudre est alors reprise dans 100 mL d'éthanol anhydre puis est centrifugée. Le précipité est à nouveau séché une nuit à 100°C et 1,9 g de poudre est récupéré. L'absorption atomique de la poudre donne un titre massique de 34 % en Fe. Ce qui correspond à un titre massique en Fe₃O₄ de 47,36 %. Le titre massique théorique étant de 50 %.

Le PVA est un polymère vinylique hydrosoluble et inerte (barrière à l'oxygène). La densité du composé ferrite PVA permet, dans un premier temps, une meilleure stabilité colloïdale dans l'eau. En effet, la densité des particules composites (Fe₃O₄+PVA) obtenue est de 1,87 au lieu de 5,17 si les particules avaient été composées de Fe₃O₄ pur. On évite ainsi la décantation des billes magnétiques lors de leur utilisation. Le PVA peut également s'hydrater ou se contracter ainsi il est possible de modifier facilement la taille de la particule, il peut aussi se réticuler afin de bloquer les changements de volume. Le PVA permet donc d'avoir des particules magnétiques de même taille.

Afin de pouvoir modifier la surface de ces billes et donc avoir la possibilité de leur greffer des anticorps ou autres chaînes polymériques, une couche de silice par sol-gel est synthétisée.

Sous agitation mécanique, 1 g de particules Fe₃O₄-PVA dans 200 ml d'éthanol absolu est dispersé. Dans ce milieu anhydre, le PVA du composite est compacté. Puis sous agitation, 0,5 g d'un mélange d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) et d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) dans un rapport molaire TEOS/APTES = 20/1 (l'APTES sert de catalyseur pour initier la polymérisation de la couche de silice) est ajouté. Après 10 minutes d'homogénéisation, 1 g d'eau DI est ajouté. Le milieu est alors laissé sous agitation mécanique 12 h à température ambiante. Le produit est récupéré par centrifugation, lavé trois fois à l'eau DI. Le potentiel zéta (charge électrique de surface) des particules passe à -20/-30 mV, prouvant que l'on a bien construit une couche de silice à la surface des particules.

Dans une variante, on peut réticuler le PVA en faisant réagir un réticulant de celui-ci : $B(OR)_3$, $RB(OH)_2$, $B(OH)_3$ ou $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ avant de faire croître la couche de silice. L'intérêt des composés tels que $RB(OH)_2$ est de pouvoir greffer une autre fonction organique sur le PVA : un colorant fluorescent. Nous avons testé l'acide quinoléine-3-boronique ([paragraphe 3.4.2.3.7](#)). Sous agitation mécanique, 1 g de particules Fe_3O_4 -PVA est dispersé dans 200 mL d'eau DI. Puis toujours sous agitation 0,2 g d'acide quinoléine-3-boronique est ajouté à 50 mL de tétrahydrofurane (THF). Le milieu est alors laissé sous agitation mécanique 12 h à température ambiante. Le produit est récupéré par centrifugation, lavé trois fois à l'eau DI, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation. Le produit montre une fluorescence à 540 nm lorsqu'il est excité à 400 nm.

Les particules magnétiques doivent présenter des fonctions acides carboxyliques de surface pour pouvoir réagir avec de l'EDC qui permettra le couplage avec une molécule biologique.

Le potentiel zéta de la couche de silice est alors modifié en hydrolysant un sel d'aluminium ($AlCl_3$, $Al(NO_3)_3$). Cela se fait facilement sur les billes de Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 car l'APTS est utilisé comme catalyseur. Celui-ci participe au réseau de silice en laissant des fonctions amines primaires pendantes sur lesquelles les sels d'aluminium vont s'hydrolyser pour former une couche d' $Al(OH)_3$.

Sous agitation mécanique, 1 g de particules Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 est dispersé dans 200 mL d'eau DI. Puis toujours sous agitation, 0,3 g d'un sel d'aluminium hydraté est ajouté. Le milieu est alors laissé sous agitation mécanique 12 h à température ambiante. Le produit est récupéré par centrifugation, lavé trois fois à l'eau DI. Le potentiel zéta des particules passe à + 15 mV, prouvant que l'on a bien synthétisé une couche d' $Al(OH)_3$ à la surface des particules.

Pour l'utilisation finale de ces billes, il faut que les particules magnétiques portent en surface des fonctions acides carboxyliques pendantes. Deux voies de synthèse ont été mises en place à partir des particules chargées positivement (résultats non présentés, en cours de synthétisation).

- Réaction directe d'acide phosphonoacétique ou d'acide phosphonopropionique

Les $Al-OH$ de surface vont réagir avec l'acide pour former des complexes bidentés. Sous agitation mécanique, 1 g de particules Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 à surface $Al(OH)_3$ est dispersé dans 200 mL d'eau DI. Puis toujours sous agitation, 0,2 g d'acide phosphonoacétique et/ou d'acide phosphonopropionique sont ajoutés. Le milieu est alors laissé sous agitation mécanique 12 h à température ambiante. Le produit est récupéré par centrifugation, lavé trois fois à l'eau DI. Le potentiel zéta des particules passe à -10mV, prouvant que l'on a passivé une partie de la couche d' $Al(OH)_3$ à la surface des particules.

- Réaction de poly anhydride carboxylique aromatique

La réaction d'un dianhydride d'acide carboxylique aromatique comme le perylene-3,4,9,10-tétracarboxylic dianhydride sur les $Al-OH$ de surface conduit à la formation d'un complexe bidenté très solidement attaché à la surface $Al(OH)_3$. Si le pH de la suspension colloïdale devient acide entre 4 et 5, la deuxième fonction anhydride s'ouvre formant un complexe qui porte deux fonctions acides carboxyliques pendantes. Ce greffon est fluorescent (excitation à 420 nm donc dans les basses énergies, fluorescence dans le rouge). De plus quand les groupements carboxyliques pendants réagissent la fluorescence varie. C'est donc une sonde qui permettra d'évaluer la qualité du couplage EDC.

Sous agitation mécanique, 1 g de particules Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 à surface $Al(OH)_3$ est dispersé dans 200 mL d'eau DI. Puis toujours sous agitation, 0,1 g de perylene-3,4,9,10-tétracarboxylic dianhydride est ajouté dans 15 mL de THF. Le milieu est alors laissé sous agitation mécanique 12 h à température ambiante. Le produit est récupéré par centrifugation, lavé trois fois à l'eau DI. Le potentiel zéta des particules passe à -5

mV, prouvant que l'on a passivé une partie de la couche d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ à la surface des particules. Les particules sont de couleur rouge.

3.4.2.3.4. Billes magnétiques Fe_3O_4 -PVA- SiO_2

A ce stade, les particules magnétiques ne présentent aucune fonction acide carboxylique de surface. Il n'est donc pas possible de les activer à l'EDC pour permettre le couplage avec une molécule biologique (anticorps). Il n'est donc pas nécessaire de les mettre en présence de cellules NS1, mais uniquement en présence de milieu de culture afin d'évaluer leur état d'agrégation.

Ces billes sont monodisperses en solution (Fig. 3.26A), ce qui est indispensable pour nos expériences. Cependant, bien que très dispersables, l'agrégation reste importante comme on peut le voir sur la Fig. 3.26B.

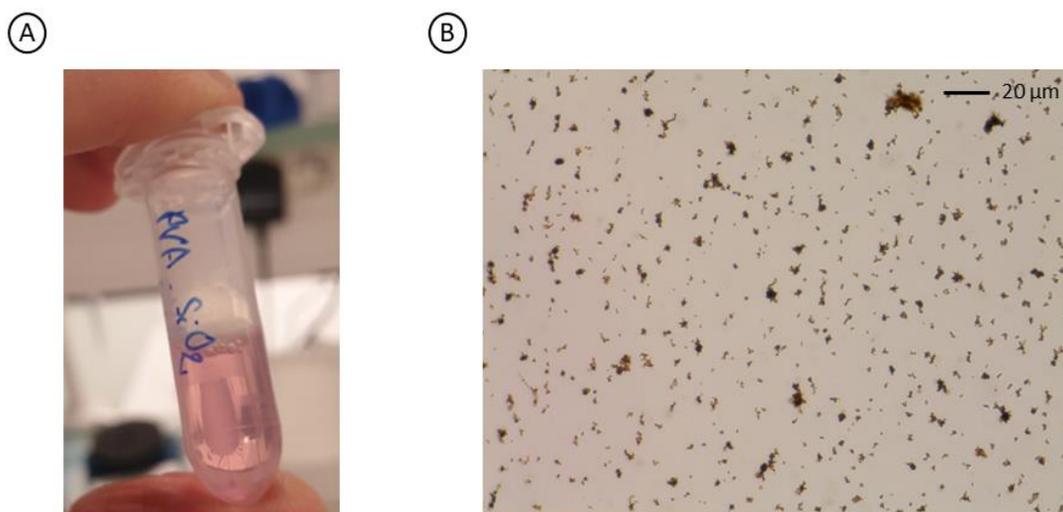


Fig. 3.26 - Dispersibilité et agrégation des billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 dans du milieu de culture

A) Bonne dispersion des billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 dans du milieu de culture après une incubation sous agitation de 2 h à 20°C. B) 2 µL de billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 après 2 h d'incubation sous agitation à 20°C dans 1 mL de milieu de culture.

3.4.2.3.5. Billes magnétiques Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 - SiCH_2 -OH

Les billes Fe_3O_4 -PVA- SiO_2 sont recouvertes d'une couche de vinyle qui permet d'éloigner au maximum les cœurs magnétiques de chaque bille et donc d'éviter potentiellement l'agrégation des billes entre elles. Ces billes ne sont toujours pas fonctionnalisables par des anticorps. Il n'est donc pas nécessaire de les mettre en solution avec des cellules NS1 pour l'instant.

Ce lot est toujours bien dispersable mais l'agrégation reste présente et en forme de serpents (due à un magnétisme rémanent engendré lors du processus) (Fig. 3.27). En conséquence et suite à ces observations avec ce lot de billes vinyliques, le protocole d'élaboration des billes a été modifié par la suite de sorte à éviter toute aimantation des billes (remplacement par des centrifugations).

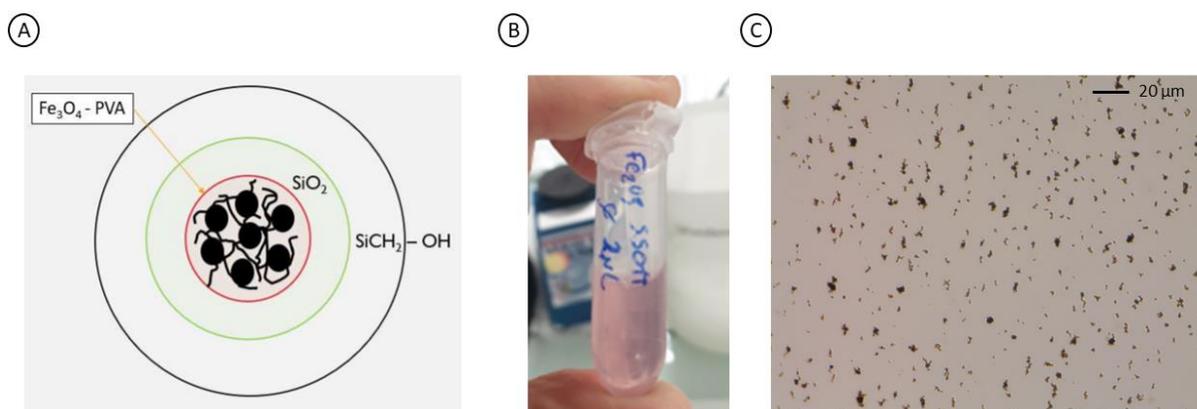


Fig. 3.27 - Composition, dispersibilité et agrégation des billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-SiCH}_2\text{-OH}$

A) Détails de la composition des billes magnétiques $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-SiCH}_2\text{-OH}$. B) Bonne dispersion des $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-SiCH}_2\text{-OH}$ dans du milieu de culture après une incubation sous agitation de 2 h à 20°C. C) 2 µL de billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-SiCH}_2\text{-OH}$ après 2 h d'incubation sous agitation à 20°C dans 1 mL de milieu de culture.

3.4.2.3.6. Billes magnétiques $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-NH}_2$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ P-COOH

Après les résultats obtenus sur les billes vinyliques, il a été décidé de s'intéresser à l'introduction de fonctions carboxyles en surface des billes afin de permettre le greffage ultérieur des anticorps sur les billes magnétiques. En effet, nous avons vu précédemment que l'état d'agrégation des billes peut empirer après fonctionnalisation par les anticorps, il est donc important d'introduire (pas trop tardivement) ce facteur d'agrégation dans la recherche de billes à grande stabilité colloïdale.

Pour permettre le greffage des anticorps aux billes, il est nécessaire que ces dernières tolèrent des conditions de pH acide comprises entre 4,5 et 6 sans s'agréger (pour permettre l'activation des fonctions carboxyles en ester actifs par l'EDC). Il faut donc changer le signe de la charge de surface, actuellement négatif avec les billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2$. Pour cela, une couche $\text{Al}(\text{OH})_3$ a été ajoutée afin d'obtenir une charge de surface positive. Une amination des billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2$ a été réalisée afin de greffer une fonction $(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ pendante, couche intermédiaire nécessaire pour passer à de l'alumine. Une fois la charge de surface positive, un acide phosphonique (rendant la suspension colloïdale plus stable que l'acide carboxylique) a été ajouté afin de pouvoir greffer les anticorps.

Afin de fonctionnaliser les anticorps sur les billes magnétiques, le même protocole de couplage que pour les billes Adembeads de 200 nm a été utilisé ([paragraphe 3.2.2.5](#)).

Ensuite, 10^9 billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 sont ajoutées à 1 mL de milieu de culture contenant différentes concentrations de cellules NS1 allant de 10^2 à 10^5 NS1/mL. Des tests ont également été réalisés avec les cellules non pertinentes CHO ainsi qu'avec les billes fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique seules. Tous les échantillons ont été incubés sous agitation 2 h à 20°C.

Les résultats obtenus ([Fig. 3.28](#)) sont assez encourageants. Certes la labélisation des cellules NS1 par les billes fonctionnalisées n'est pas optimale mais la dispersion est très bonne et le nombre d'agrégat a nettement diminué. Ceci est possible grâce à la charge de surface de ces billes qui est légèrement négative et grâce à l'alumine qui assurent la réduction des agrégats et la stabilité colloïdale dans du milieu de culture.

Ces résultats sont nettement meilleurs que les tests réalisés avec les billes Adembeads de taille pratiquement équivalente.

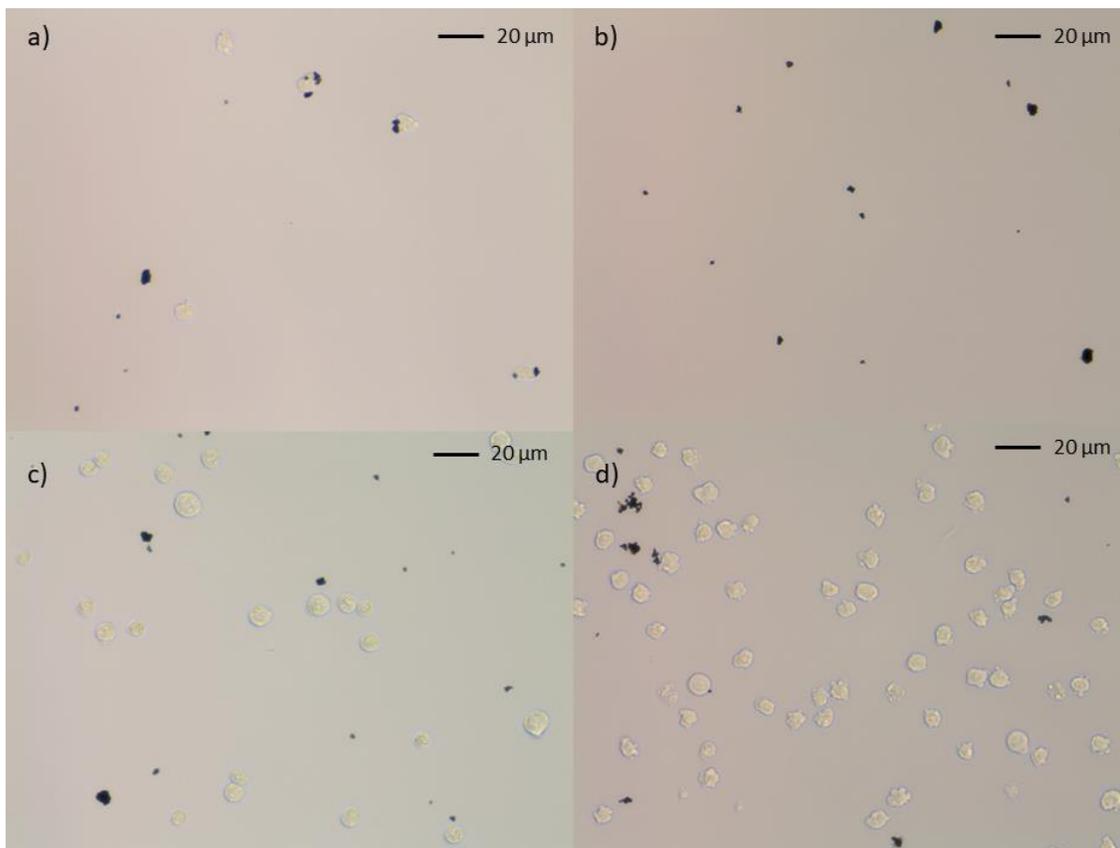


Fig. 3.28 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-NH}_2$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ P-COOH fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138

10^9 billes magnétiques $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-NH}_2$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ P-COOH fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10^3 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, b) 1 mL de milieu de culture seul, c) 10^4 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL et d) 10^5 cellules CHO dans un volume final de 1 mL.

3.4.2.3.7. Billes magnétiques $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-Bore quinoline-P-COOH}$

Les billes fabriquées étant de taille nanométrique, il n'est pas possible de contrôler l'agrégation au microscope optique. Il a donc été décidé de greffer un composé fluorescent à leur surface afin de pouvoir les observer plus facilement sous microscope, et donc de mieux apprécier l'immunocapture et la labélisation magnétique des cellules NS1, mais aussi l'état d'agrégation.

Plusieurs composés fluorescent ont été testés :

- Le bore quinoline
- L'euporium
- La dopamine

Cependant, nous avons retenu uniquement le bore quinoline. Pour l'euporium, aucune labélisation n'est visible et pour les premiers tests avec la dopamine, une rémanence magnétique est présente. Les expériences vont donc se poursuivre avec la dopamine.

Concernant la fonctionnalisation des billes $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVA-SiO}_2\text{-Bore quinoline-P-COOH}$ avec l'anticorps spécifique le même protocole que pour les Adembeads de 200 nm a été utilisé.

Ensuite 10^9 billes fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 sont ajoutées à 1 mL de milieu de culture contenant 10^5 NS1/mL. Des tests ont également été réalisés avec les cellules non pertinentes CHO ainsi qu'avec les billes fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique seules. Tous les échantillons ont été incubés sous agitation 2 h à 20°C.

D'après la **Fig. 3.29**, la labélisation des cellules NS1 est nettement meilleure que précédemment mais de gros agrégats sont présents.

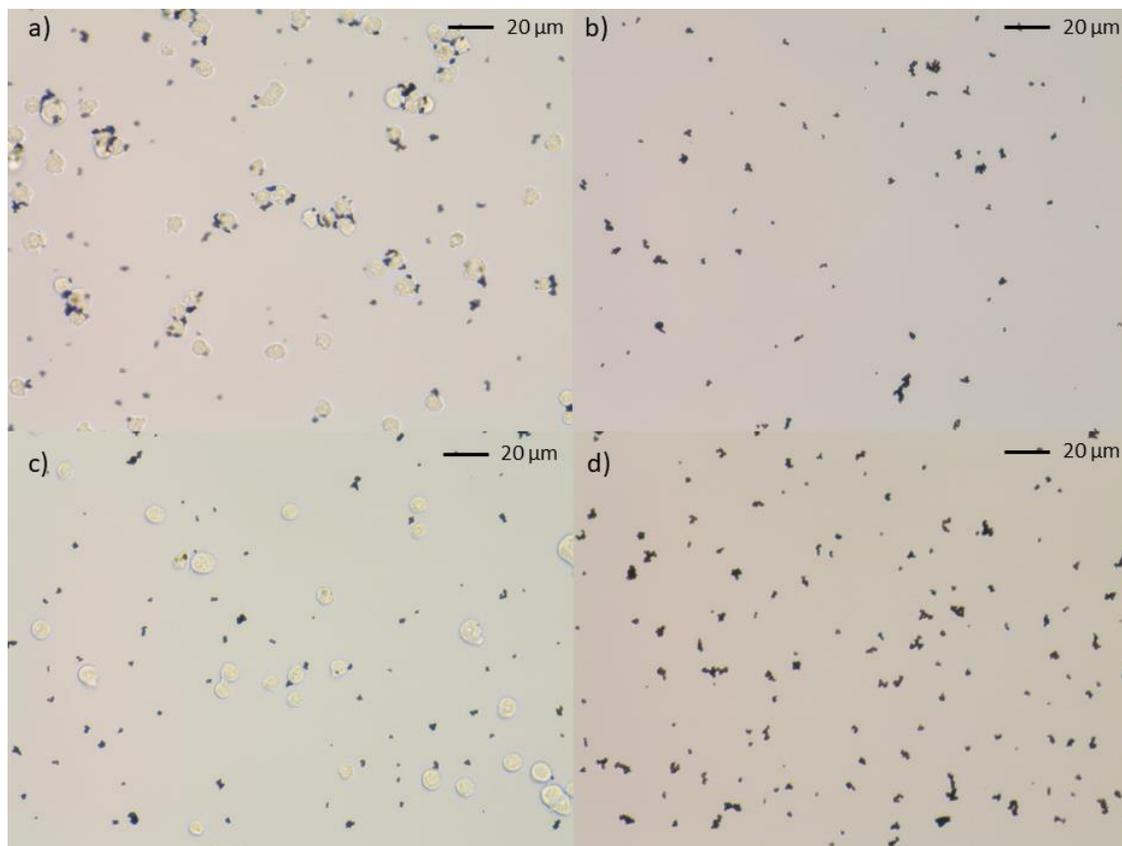


Fig. 3.29 - Illustrations photographiques (microscope optique) du marquage magnétique des cellules NS1 par les Fe_3O_4 -PVA-SiO₂-bore quinoline-P-COOH fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138

10^9 billes magnétiques Fe_3O_4 -PVA-SiO₂-bore quinoline-P-COOH fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 ont été mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec a) 10^5 cellules NS1 dans un volume final de 1 mL, c) 10^5 cellules CHO dans un volume final de 1 mL, b) et d) 1 mL de milieu de culture seul.

Afin de tenter de résoudre ces problèmes et après quelques recherches bibliographiques [21], le protocole de greffage des anticorps a été légèrement modifié, en particulier concernant l'EDC. En effet, pour fonctionnaliser les billes magnétiques, les fonctions carboxyliques de surface sont, dans un premier temps, modifiées en esters activés par réaction à l'EDC. Puis, dans un second temps, en présence des amines primaires des chaînes latérales des anticorps, une liaison amide est formée, assurant ainsi le greffage covalent des anticorps à la surface des billes magnétiques. Or l'ester actif n'est pas stable dans l'eau et d'après le protocole des Adembeads, il est conseillé d'incuber le mélange 10 minutes à 37°C. Nous avons donc tenté de supprimer cette incubation juste après la mise en solution des billes dans l'EDC (avant le couplage des anticorps sur les billes). Cela n'a eu aucun effet sur la labélisation ou l'agrégation. De même, une gamme de concentration en EDC a été réalisée (2 mg/mL, 4 mg/mL et 20 mg/mL), aucun changement notable n'a été observé. Pareillement, lorsque l'acide phosphonoacétique est ajouté en excès afin de favoriser la fonctionnalisation.

3.4.2.3.8. Conclusion

La fabrication de billes de diamètre plus petit et colloïdales est en cours d'étude et devrait permettre d'éliminer au fur et à mesure les agrégats de billes responsables des faux positifs. Des études sont encore en cours afin d'améliorer la labélisation magnétique des cellules par les billes fonctionnalisées ainsi que de réduire au maximum les agrégats.

3.5. Autres techniques de diagnostic

Afin de comparer les résultats obtenus sur le modèle cellulaire par la biopuce GMR à deux étages, trois autres techniques de diagnostic utilisées en routine dans les laboratoires de biologie ont été réalisées :

- Un test bandelette très prisé pour une détection rapide sur le terrain.
- Un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilisé pour détecter mais aussi doser des objets biologiques.
- De la cytométrie en flux pertinente pour la détection d'objet biologique un à un.

3.5.1. Test bandelettes

Dans un premier temps, deux types de bandelettes ont été réalisés au LERI. Des bandelettes PRIMA 40 saturées (avec bain de saturation en BSA) et des bandelettes PRIMA 40 non saturées.

Préparation des bandelettes saturées : l'anticorps spécifique (anti-CD138) de la ligne test à 1 mg/mL et les anticorps CAS (anticorps de chèvre anti-Ig de souris) à 0,5 mg/mL de la ligne contrôle en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sont déposés sur les bandelettes PRIMA 40 de 30 cm de long. Ensuite, les bandelettes sont séchées 1 h à 37°C puis saturées sous agitation dans un bain de PBS dans lequel 0,5 % de BSA sont ajoutés. Elles sont ensuite lavées trois fois avec de l'eau purifiée (eau Milli-Q) puis trempées de nouveau pendant 20 minutes sous agitation, dans un bain de PBS dans lequel 7,5 % de glucose, 0,1 % de Tween 20 sont ajoutés. Elles sont séchées 30 minutes à 37°C puis les tampons absorbants sont collés de chaque côté (dans le sens de la longueur) des bandelettes. Pour la partie haute de la bandelette, du tampon CF5 est utilisé et pour la partie basse de la bandelette du tampon standard 14. Et pour finir, elles sont découpées à la guillotine en petite bandelette de 5 mm de largeur.

Préparation des bandelettes non saturées : l'anticorps spécifique (anti-CD138) de la ligne test à 1 mg/mL et les anticorps CAS (anticorps de chèvre anti-Ig de souris) à 0,5 mg/mL de la ligne contrôle en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 dans lequel sont ajoutés 5 % de sucrose et 3 % d'isopropanol pour une meilleure conservation des anticorps sont déposés sur les bandelettes PRIMA 40 de 30 cm de long. Elles sont séchées 2 h à 37°C puis les tampons absorbants sont collés de chaque côté (dans le sens de la longueur) des bandelettes. Pour la partie haute de la bandelette, du tampon CF5 est utilisé et pour la partie basse de la bandelette du tampon standard 14. Et pour finir, elles sont découpées à la guillotine en petite bandelette de 5 mm de largeur.

Préparation de l'or colloïdal : une solution de citrate de sodium 1 % est préparée puis filtrée sur 0,22 µm. Ensuite, 40 mL d'eau milliQ est chauffée jusqu'à ébullition puis, sous agitation, 4 mL d'or chlorure et 1 mL de solution citrate de sodium 1 % sont ajoutés. Une couleur « lie de vin » doit apparaître. La solution est ensuite laissée à l'air ambiant afin de refroidir et est stockée à l'abri de la lumière à 4°C.

Couplage des anticorps à l'or colloïdal : les anticorps spécifiques permettant de détecter la cible d'intérêt vont être couplés de manière non covalente à l'or colloïdal. Deux protocoles sont envisageables.

- Premier protocole : 50 µg d'anticorps spécifiques à 1 mg/mL sont repris dans 300 µL de tampon borax 20 mM pH 9,3 puis 2 mL d'or colloïdal préparé précédemment sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé 1 h à température ambiante puis 200 µL de tampon borax 20 mM pH 9,3 additionné de 1 % de BSA sont ajoutés. Le surnageant est ensuite éliminé par centrifugation à 15000 g pendant 30 minutes et le culot est repris dans 2 mL de tampon borax 2 mM pH 9,3 additionné de 1 % de BSA. Ces deux étapes sont répétées une seconde fois. Et pour finir, le culot est repris dans 500 µL de tampon borax 2 mM additionné de 1 % de BSA puis stocké à l'abri de la lumière à 4°C.
- Deuxième protocole : Les anticorps spécifiques à 1 mg/mL sont dilués en tampon phosphate de potassium 50 mM. 50 µL d'anticorps sont ajoutés à 251 µL d'or colloïdal commercial NG biotech à 15,93 DO (densité optique), puis 249 µL de tampon borate 20 mM pH 9 sont ajoutés. La solution est ensuite incubée 1 h sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière. 250 µL de tampon borate 10 mM pH 9 additionné de 0,3 % de NaCaséine sont ajoutés. La solution est centrifugée 30 minutes à 150000 g, le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 500 µL de tampon borate 10 mM pH 9 additionné de 0,3 % de NaCaséine. La solution est vortexée, soniquée quelques secondes puis stockée à 4°C à l'abri de la lumière.

3.5.2. Tests ELISA sandwich

Des plaques de 96 puits sont coatées avec 100 µL par puit d'anticorps anti-CD138 en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Les plaques sont ensuite incubées une nuit à 20 °C puis elles sont vidées et saturées avec 300 µL de tampon EIA (composé de tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,4 ; 0,15 M NaCl ; 0,1 % de BSA et 0,01 % d'azide de sodium) afin de saturer la totalité des puits et être sûr que les sites ne possédant pas d'anticorps sont saturés par la BSA et qu'aucune autre molécule puisse se fixer à d'autre endroit que sur les anticorps coatés. Elles sont ensuite scellées et conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Un premier lavage est effectué avec du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 afin d'éliminer les anticorps qui ne sont pas fixés et le tampon EIA. Puis 100 µL par puit des différentes solutions préalablement préparées sont déposées en duplicate dans les puits coatés.

Les solutions préparées sont les suivantes :

- Gamme de concentrations de $3 \cdot 10^6$ à 10^3 cellules NS1/mL (1/3 en 1/3) en milieu de culture.
- Gamme de concentrations de 10^6 à 10^2 cellules CHO/mL (10 en 10) en milieu de culture.
- 8 puits en milieu de culture seul (afin de déterminer le bruit de fond).

La plaque est incubée 2 h à 20°C puis trois lavages sont effectués en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sans Tween20 pour ne pas dégrader les cellules. 100 µL par puit d'anticorps anti-CD18 biotinylés à 200 ng/mL ou 400 ng/mL en tampon EIA sans azide (antibactérien qui pourrait dégrader les cellules) sont ajoutés puis la plaque est incubée 2 heures à 20°C. Ensuite, trois lavages sont à nouveau effectués en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sans Tween20.

Deux modes de révélation peuvent être considérés :

- Premier mode de révélation : 100 µL par puit de streptavidine couplée à l'enzyme acétylcholinestérase (abrégée en Streptavidine-G₄) à 1 UE/mL/mn en tampon EIA sont ajoutés. L'enzyme G₄ provient des organes électriques du gymnote (poisson d'eau douce). Elle est achetée commercialement puis couplée covalamment à la streptavidine au LERI. La plaque est ensuite incubée 1 h à 20°C sous agitation afin de former les liaisons biotine-streptavidine suivi

de cinq lavages en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sans Tween20 afin d'éliminer tout ce qui n'est pas spécifique et avoir un faible bruit de fond. Puis, afin de procéder à la révélation colorimétrique, 200 μ L par puit du réactif d'Ellman 0,1 M sont ajoutés. Pour finir, la lecture des plaques se fait au spectromètre à la longueur d'onde de 414 nm après 30 minutes, 1 heure et 2 heures de réaction.

- Deuxième mode de révélation : 100 μ L par puit de streptavidine couplée à l'enzyme peroxydase de raifort (abrégée en Streptavidine-polyHRP ou streptavidine-polyHorseRadishPeroxydase) commerciale diluée au 1/20000 en tampon EIA sans azide sont ajoutés. La plaque est ensuite incubée 30 minutes à 20°C sous agitation afin de former les liaisons biotine-streptavidine suivi de cinq lavages en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 sans Tween20 afin d'éliminer tout ce qui n'est pas spécifique et avoir un faible bruit de fond. Puis, afin de procéder à la révélation colorimétrique, 100 μ L par puit d'une solution de TMB sont ajoutés. La plaque est incubée 30 minutes à 20°C sous agitation puis la solution est stoppée avec l'ajout de 100 μ L par puit d'acide sulfurique 2 M. Pour finir, la lecture des plaques se fait au spectromètre à des longueurs d'onde de 450 nm et 620 nm. Le signal obtenu à 620 nm est soustrait au signal obtenu à 450 nm et les limites de détection et de quantification sont obtenues.

3.5.3. Cytométrie en flux

Différentes concentrations en NS1 (de 10^3 à 10^5 NS1/mL) ont été étudiées par échantillon de 200 μ L en PBS dans lequel 0,5 % de BSA a été ajouté. Ces échantillons sont ensuite incubés 2 h à température ambiante avec la même quantité d'anticorps couplé au fluorophore Phycoérythrine pour chaque concentration de cellules. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois en PBS additionné de 0,5 % de BSA suivi pour chacun des lavages d'une centrifugation. Et pour finir, les cellules sont reprises dans 200 μ L de ce même tampon. Chaque échantillon de 200 μ L est passé en cytométrie en flux. Ainsi le niveau de fluorescence de chaque population présente dans l'échantillon est évalué et comparé à l'échantillon témoin de 10^5 NS1/mL dans le même tampon mais sans anticorps fluorescent.

3.6. Références

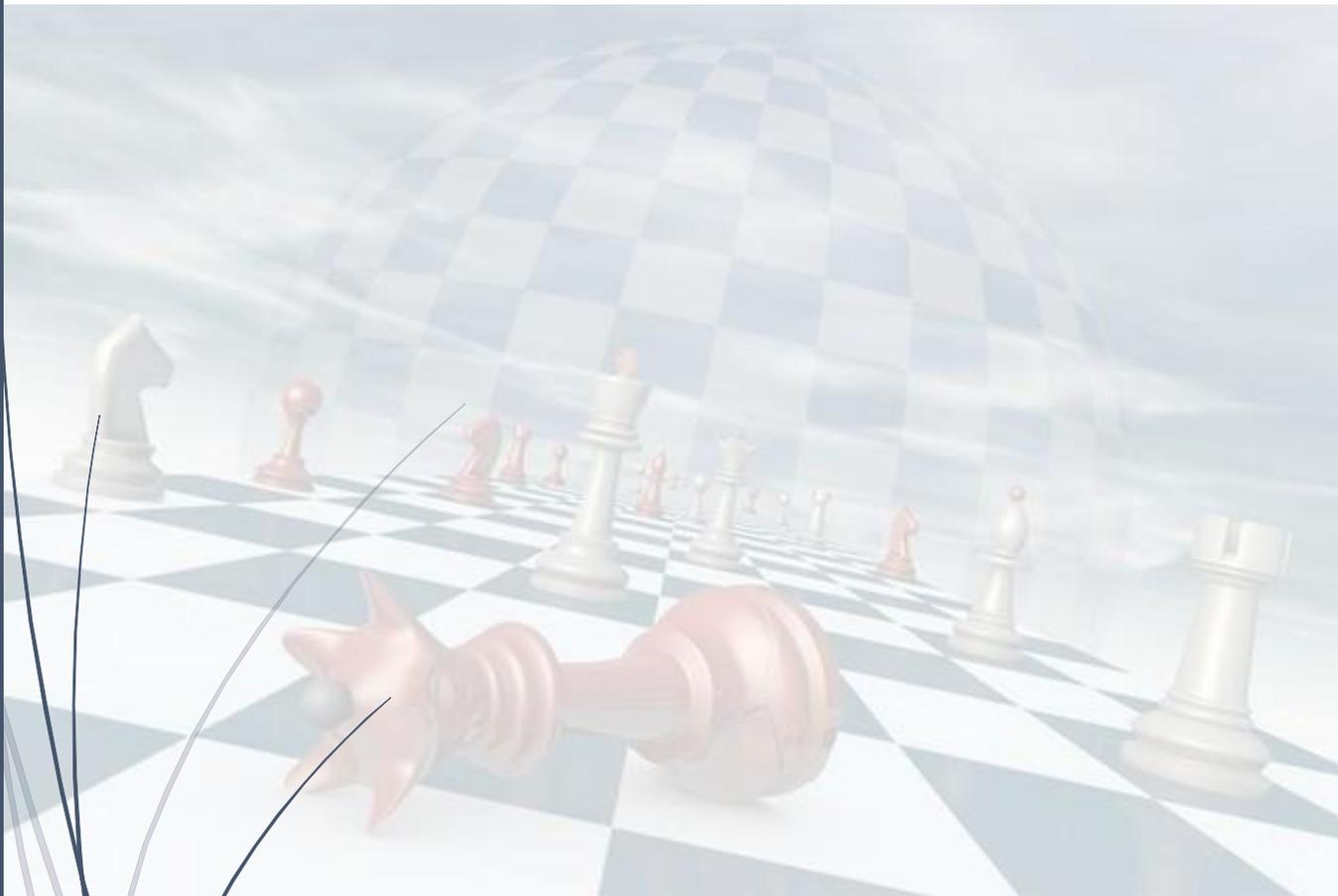
- [1] Giraud M. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnétorésistance géante n.d.:170.
- [2] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–7. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- [3] Altarev I, Babcock E, Beck D, Burghoff M, Chesnevskaya S, Chupp T, et al. A magnetically shielded room with ultra low residual field and gradient. *Review of Scientific Instruments* 2014;85:075106. <https://doi.org/10.1063/1.4886146>.
- [4] Lee C-P, Lai M-F, Huang H-T, Lin C-W, Wei Z-H. Wheatstone bridge giant-magneto-resistance based cell counter. *Biosensors and Bioelectronics* 2014;57:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.028>.
- [5] Reisbeck M, Helou MJ, 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. <https://doi.org/10.1038/srep32838>.

- [6] Moulin J, Doll A, Paul E, Pannetier-Lecoer M, Fermon C, Sergeeva-Chollet N, et al. Optimizing magnetoresistive sensor signal-to-noise via pinning field tuning. *Appl Phys Lett* 2019;115:122406. <https://doi.org/10.1063/1.5108604>.
- [7] Chopin C, Torrejon J, Solignac A, Fermon C, Jendritza P, Fries P, et al. Magnetoresistive Sensor in Two-Dimension on a 25 μm Thick Silicon Substrate for In Vivo Neuronal Measurements. *ACS Sens* 2020;5:3493–500. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01578>.
- [8] Sorgi C, De Gennaro V. Analyse microstructurale au MEB environnemental d'une craie soumise à chargement hydrique et mécanique. *Comptes Rendus Geoscience* 2007;339:468–81. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2007.06.003>.
- [9] Giraud M, Delapierre F-D, Wijkhuisen A, Bonville P, Thévenin M, Cannies G, et al. Evaluation of In-Flow Magnetoresistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool. *Biosensors* 2019;9:105. <https://doi.org/10.3390/bios9030105>.
- [10] Rosa EA, Lanza SR, Zanetti CR, Pinto AR. Immunophenotyping of Classic Murine Myeloma Cell Lines Used for Monoclonal Antibody Production. *Hybridoma* 2012;31:1–6. <https://doi.org/10.1089/hyb.2011.0080>.
- [11] Oliver AM, Martin F, Kearney JF. Mouse CD38 is down-regulated on germinal center B cells and mature plasma cells. *The Journal of Immunology* 1997;158:1108–15.
- [12] Mariani M, Camagna M, Tarditi L, Seccamani E. A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)₂ suitable for clinical use from mouse IgG1. *Mol Immunol* 1991;28:69–77. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(91\)90088-2](https://doi.org/10.1016/0161-5890(91)90088-2).
- [13] Wu H, Kroe-Barrett R, Singh S, Robinson AS, Roberts CJ. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *FEBS Letters* 2014;588:936–41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.051>.
- [14] Sierocki R, Jneid B, Delgado MLO, Plaisance M, Maillère B, Nozach H, et al. An antibody targeting type III secretion system induces broad protection against Salmonella and Shigella infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2021;15:e0009231. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009231>.
- [15] Gauci PJ, Alderton MR. Pepsin Digestion of Antibodies to Produce Functional Antigen-Binding Fragments (Fab): A Scientific Fantasy? n.d.:25.
- [16] Rosenstein S, Vaisman-Mentesh A, Levy L, Kigel A, Dror Y, Wine Y. Production of F(ab')₂ from Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Curr Protoc Mol Biol* 2020;131:e119. <https://doi.org/10.1002/cpmb.119>.
- [17] La chromatographie. Planet-Vie n.d. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-chromatographie>.
- [18] Lowry GV, Hill RJ, Harper S, Rawle AF, Hendren CO, Klaessig F, et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environ Sci: Nano* 2016;3:953–65. <https://doi.org/10.1039/C6EN00136J>.
- [19] jcmarot A. Nano (4) Potentiel Zêta. *Chantiers de Sciences* 2021. <https://jcmarot.com/2021/02/09/nano-4-potentiel-zeta/>.
- [20] Nguyen M, Tran H-V, Xu S, Lee T. Fe₃O₄ Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications. *Applied Sciences* 2021;11:11301. <https://doi.org/10.3390/app112311301>.

[21] Hermanson GT. Chapter 4 - Zero-Length Crosslinkers. In: Hermanson GT, editor. Bioconjugate Techniques (Third Edition), Boston: Academic Press; 2013, p. 259–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00004-2>.



4 - Résultats sur un modèle de cellules eucaryotes & Discussion



Maikane DEROO

4.1. Table des figures & tableaux

Fig. 4.1- Champ dipolaire théorique calculé et produit simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (traits pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Dynabeads MyOne de 1 μm en fonction de leur hauteur de passage z_B (26 μm) dans le canal.....143

Fig. 4.2 - Schéma de la biopuce GMR à deux étages afin d'expliquer la dissymétrie du faisceau de courbe des champs dipolaires haut et bas si les espaceurs n'ont pas la même épaisseur.....144

Fig. 4.3 - Histogramme du nombre de coïncidences en fonction de la hauteur de passage dans le canal microfluidique z_B (A et B, en haut) ou en fonction du nombre de billes détectées par objet magnétique (C et D, en bas) pour des expériences réalisées avec des billes Dynabeads MyOne de 1 μm146

Fig. 4.4 - Evaluation de la sensibilité de détection des cellules NS1 par la biopuce GMR avec des billes Dynabeads MyOne 1 μm fonctionnalisées anti-CD138.....149

Fig. 4.5 - Illustrations photographiques (microscope optique) de causes biologiques des cellules non détectables par la biopuce GMR.....152

Fig. 4.6 - Trois simulations de signaux émis par deux cellules labélisées par 80 billes, situées à différentes positions l'une par rapport à l'autre dans le canal microfluidique, sont présentées.....154

Fig. 4.7 - Champ dipolaire théorique mesuré simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (trait pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Micromod de 500 nm en fonction de leur hauteur de passage z_B (23,5 μm) dans le canal.....155

Fig. 4.8 - Histogrammes du nombre de coïncidences en fonction de la hauteur de passage dans le canal microfluidique z_B (A et B, en haut) ou en fonction du nombre de billes détectées par objet magnétique (C et D, en bas) pour des expériences réalisées avec des billes Micromod 500 nm.....158

Fig. 4.9 - Evaluation de la sensibilité de détection des cellules NS1 par la biopuce GMR avec des billes Micromod 500 nm fonctionnalisées anti-CD138.....159

Fig. 4.10 - Rapport du signal sur bruit du test ELISA en fonction de la concentration en cellules NS1 en milieu de culture.....161

Tableau 4.1 - Quantités et différents types d'expériences réalisées sur ces trois années de thèse sur la biopuce à deux étages.....141

Tableau 4.2 - Paramètres des différentes expériences avec les billes Dynabeads MyOne de 1 μm142

Tableau 4.3 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons tests et les témoins négatifs avec les billes Dynabeads MyOne de 1 μm145

Tableau 4.4 - Comptage des cellules NS1 (10^4 et 10^5 cellules/mL) avant et après l'expérience.....151

Tableau 4.5 - Paramètres des différentes expériences avec les billes Micromod 500 nm.....155

Tableau 4.6 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons tests et les témoins négatifs avec les billes Micromod 500 nm.....156

Tableau 4.7 - Récapitulatif et comparatif des critères ASSURED pour les expériences réalisées avec les billes Dynabeads MyOne et Micromod 500 nm sur la biopuce GMR à deux étages.....160

Tableau 4.8 - Limite de détection et de quantification des tests ELISA en milieu de culture.....162

Tableau 4.9 - Comparaison des performances de la biopuce GMR à deux étages avec celles des tests bandelettes, ELISA, cytométrie en flux et biopuce GMR à un étage.....163

Le développement de la biopuce à deux étages GMR ouvre des perspectives très intéressantes pour augmenter à la fois la spécificité et la sensibilité de détection des objets biologiques cibles. Ainsi, les performances de cette biopuce en tant que méthode de diagnostic, telles que la sensibilité, la spécificité et la robustesse, mais aussi la rapidité et la facilité d'utilisation, ont pu être évaluées durant ces trois années de thèse.

L'évaluation des performances de cette détection GMR a été réalisée avec des cellules NS1 eucaryotes (objet biologique de 6 µm de diamètre en moyenne), dont les résultats sont présentés dans ce chapitre 4. Mais il est à noter que quelques autres expériences préliminaires ont également été menées avec des objets biologiques de plus petite taille, les bactéries *Xanthomonas arboricola*, d'environ 1 µm de diamètre, et dont les résultats seront discutés dans le [chapitre 5](#) -

4.2. Résultats

Lors de ces trois années de thèse, différentes expériences dans différents milieux et avec différentes billes magnétiques ont été réalisées ([Tableau 4.1](#)) :

Tableau 4.1 - Quantités et différents types d'expériences réalisées sur ces trois années de thèse sur la biopuce à deux étages
MC = milieu de culture, PBS = Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin), SVF = sérum de veau fœtal, PL = plasma de lapin.

Milieux utilisés				Objets biologiques détectés			Billes magnétiques utilisées					
MC	PBS	SVF	PL	Cellules NS1	Bactéries	Aucun	Dyna 2,8 µm	Dyna 1 µm	Micromod 500 nm	Adem 200 nm	Mix billes	Billes Liten
51	23	1	1	62	5	9	1	60	3	6	5	1

Comme décrit dans le [chapitre 3](#) -, chaque expérience suit un protocole expérimental bien précis. La grande majorité des résultats pour la détection des cellules NS1 a été obtenue dans du milieu de culture avec les billes Dynabeads MyOne Streptavidin T1 de 1 µm de diamètre (fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 biotinylé). Quant aux billes, Micromod 500 nm fonctionnalisées par le même anticorps, elles immunocapturent difficilement les cellules NS1. Les billes Adembeads carboxyles 200 nm génèrent énormément d'agrégats après fonctionnalisation avec l'anticorps spécifique de rat anti-CD138. Enfin, le procédé de fabrication des billes du LITEN n'est pas encore optimal pour nous permettre d'obtenir de bons résultats.

Toutefois, ce sont les billes Adembeads 200 nm qui ont été utilisées lors des expériences avec les bactéries. D'une part, il s'agit de billes plus petites, donc avec un plus grand potentiel de marquage magnétique de la surface des bactéries, qui sont des objets biologiques plus petits que les cellules NS1. D'autre part, comme présenté dans le [paragraphe 3.4.2.1.3](#), ces billes 200 nm s'agrègent peu lorsque fonctionnalisées par les anticorps de souris IpαD315, MIP35 ([Fig. 3.17](#)) ou l'anticorps Xantho5 ([chapitre](#)

5 -), contrairement à l'anticorps de rat anti-CD138 (l'espèce d'origine de l'anticorps jouerait-elle un rôle dans l'agrégation des billes fonctionnalisées ?).

Des expériences avec un mélange de billes Dynabeads MyOne streptavidin T1 de 1 µm et Dynabeads tosylactivées de 2,8 µm ont été réalisées au début de ces trois années de thèse sans cellules NS1 afin d'évaluer l'agrégation du mélange de ces deux types de billes, leur potentiel synergique, et la possibilité (ou pas) de leur distinguabilité en vue d'un multiplexage pour la détection. Ce dernier point resterait à approfondir, mais pour nos travaux, les billes Dynabeads MyOne 1 µm ont été choisies car beaucoup moins imposantes que les billes Dynabeads 2,8 µm ce qui permet un meilleur marquage magnétique des cellules NS1.

Pour être pertinent et attractif, un test de diagnostic se doit à minima d'être à la fois spécifique, c'est-à-dire capable de détecter uniquement la cible d'intérêt et pas (ou le moins possible) de contaminants (i.e. faux positifs), mais aussi d'être le plus sensible possible, c'est-à-dire capable de détecter la plus petite quantité possible de cible biologique d'intérêt (avec le moins possible de faux négatifs). Idéalement, tout nouveau test de diagnostic doit présenter une limite de détection qui doit être meilleure que celle des autres tests de diagnostic déjà sur le marché. D'autres critères sont, bien sûr, aussi à considérer, tels que sa simplicité d'utilisation, sa rapidité d'exécution et de rendu de résultat, sa robustesse, sa reproductibilité, son coût, sa transportabilité, sa consommation énergétique, etc. Bref, autant de critères qui permettront de situer le lieu optimal d'utilisation du test de détection/diagnostic : depuis le terrain (avec les critères ASSURED de l'OMS) jusqu'au laboratoire expert.

4.2.1. Détection GMR des cellules NS1 labélisées avec les billes magnétiques Dynabeads MyOne de 1 µm de diamètre

4.2.1.1. Données préliminaires

Tableau 4.2 - Paramètres des différentes expériences avec les billes Dynabeads MyOne de 1 µm

Date de l'expérience	Nom de la biopuce	Hauteur du canal (µm)	Épaisseur SU-8 (µm)	Épaisseur NOA81 (µm)	Sensibilité des capteurs (%/mT)	Bruit moyen capteur haut (mV)	Bruit moyen capteur bas (mV)	Volume des échantillons (µL)
28-10-2020	C2E11	20,8	2,2	5	1,13	48	46	200
10-11-2020	C2E11	20,8	2,2	5	1	37	33	200
31-03-2021	C2E14	23,5	2,2	5	0,71	40	30	200
28-04-2021	C2E15	26	2	5	0,78	61	51	200
15-04-2022	C2E23	21,2	2,5	5	1,64	40	49	1000

Afin d'établir la preuve de concept de cette nouvelle biopuce GMR à deux étages pour du diagnostic précoce, les billes Dynabeads MyOne de 1 µm ont été choisies pour leur bonne capacité de labélisation magnétique des cellules cibles, leur faible agrégation mais également pour le contrôle visuel de ces deux

paramètres avec un microscope optique grossissement 40X. Des photos de la labélisation et de l'état d'agrégation de chaque échantillon ont été prises à chaque début d'expérience (paragraphe 3.3.1.1).

Pour évaluer l'intérêt (ou pas) de l'utilisation de ces billes magnétiques pour la détection des objets biologiques dans la biopuce GMR, nous nous sommes intéressées à l'étude de deux critères : la spécificité et la sensibilité de détection.

Le **Tableau 4.2** résume l'ensemble des expériences choisies pour évaluer ces deux critères.

Au préalable, des simulations du champ dipolaire émis et produit simultanément sur les capteurs haut et bas par des objets magnétiques contenant un nombre variable de billes Dynabeads MyOne de 1 μm en fonction de leur hauteur de passage dans le canal microfluidique ont été réalisées (**Fig. 4.1**).

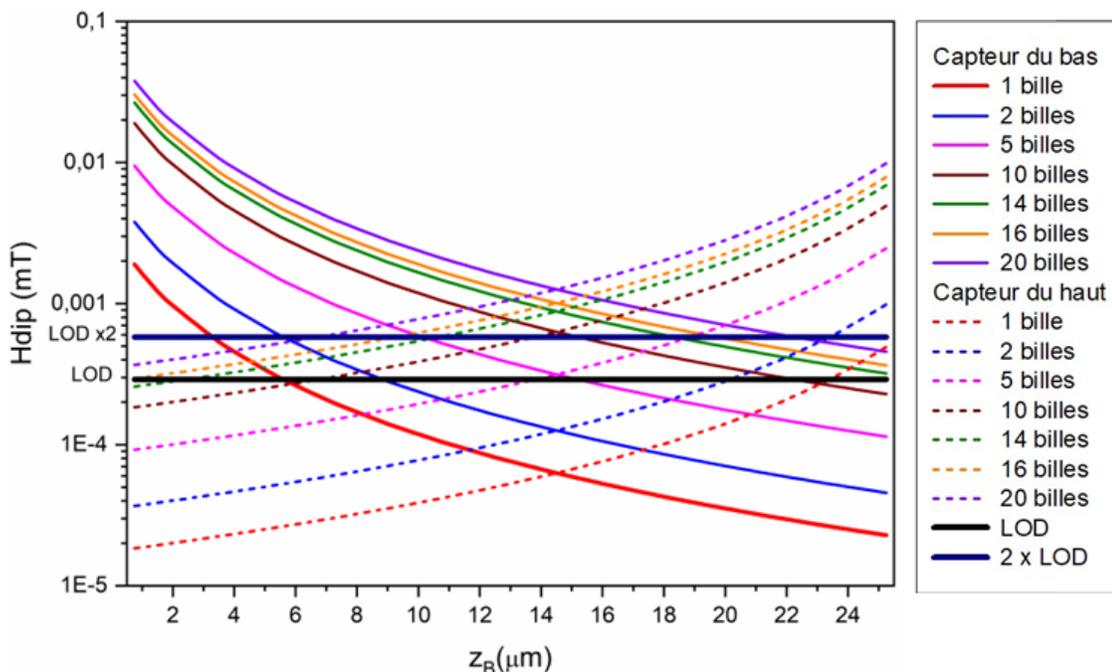


Fig. 4.1- Champ dipolaire théorique calculé et produit simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (traits pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Dynabeads MyOne de 1 μm en fonction de leur hauteur de passage Z_B (26 μm) dans le canal

La limite de détection LOD est indiquée par un trait noir gras (paragraphe 1.4.6.5).

Les coïncidences résultantes comprennent un signal dont l'amplitude est supérieure à deux fois la limite de détection (LOD) d'un capteur et l'amplitude du second signal a été fixée à une fois la limite de détection (LOD), c'est-à-dire à un rapport signal sur bruit (SNR) de 1. Les objets magnétiques qui génèrent des coïncidences avec les critères d'amplitude imposés, sont des objets magnétiques qui contiennent au moins 10 billes comme le prédit le calcul des champs dipolaires respectivement émis par les capteurs du haut et du bas (**Fig. 4.1**).

La plupart des objets magnétiques donnant lieu à une coïncidence passent au centre du canal microfluidique. Une légère dissymétrie est visible du fait que les espaceurs du haut et du bas n'ont pas la même épaisseur comme le montre les équations de la **Fig. 4.2**.

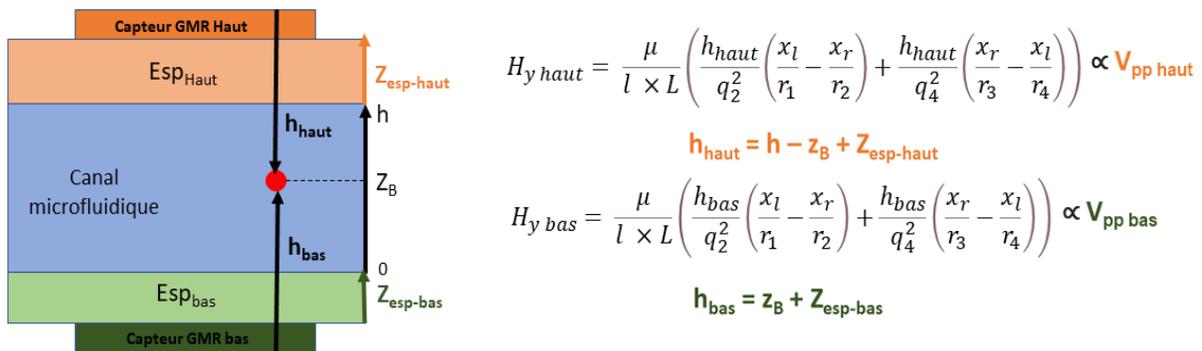


Fig. 4.2 - Schéma de la biopuce GMR à deux étages afin d'expliquer la dissymétrie du faisceau de courbe des champs dipolaires haut et bas si les espaceurs n'ont pas la même épaisseur

L'épaisseur des espaceurs (en particulier l'épaisseur de l'espaceur du bas) va changer légèrement en fonction des expériences comme indiqué dans le [Tableau 4.2](#). Cela va modifier quelque peu les valeurs du champ dipolaire mais les estimations de la [Fig. 4.1](#) restent justes.

4.2.1.2. Evaluation de la spécificité du test

Pour évaluer la spécificité de détection de la biopuce au moyen des billes magnétiques Dynabeads MyOne, nous avons analysé et comparé trois échantillons de l'expérience du 28 avril 2021 :

- Un échantillon « test positif » de 200 μL contenant 10^5 NS1/mL labélisées par des billes fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138,
- Et deux échantillons « témoins négatifs » de 200 μL chacun. Le premier contrôle négatif contient uniquement les billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées par l'anticorps spécifique anti-CD138 en milieu de culture à la même concentration que dans l'échantillon « test positif ». Le deuxième contrôle négatif contient les mêmes billes, toujours à la même concentration ($1,5 \times 10^7$ billes/mL) mais en présence de 10^5 cellules CHO (non pertinentes) par mL.

La sensibilité et le bruit expérimental des deux capteurs GMR intégrés dans la biopuce sont déterminés, comme expliqué dans le [chapitre 2](#) -, avant l'écoulement de chaque échantillon dans le canal. Les valeurs sont indiquées dans le [Tableau 4.3](#).

La [Fig. 4.3](#) présente les paramètres extraits du traitement du signal des signaux obtenus pour l'échantillon test et les deux contrôles négatifs, comme détaillé dans le [chapitre 2](#) -. Ainsi les [Fig. 4.3A](#) et [Fig. 4.3B](#) représentent le nombre de coïncidences en fonction de la position dans le canal de hauteur 26 μm et les [Fig. 4.3C](#) et [Fig. 4.3D](#) le nombre de coïncidences en fonction du nombre de billes magnétiques par objets détectés.

Comme énoncé précédemment, les coïncidences comprennent un signal dont l'amplitude est supérieure à deux fois la limite de détection (LOD) d'un capteur et l'amplitude du second signal a été fixée à une fois la limite de détection (LOD) c'est-à-dire à un rapport signal sur bruit (SNR) de 1.

Sur les [Fig. 4.3A](#) et [Fig. 4.3B](#), on peut voir que la plupart des objets magnétiques donnant lieu à une coïncidence pour l'échantillon « test positif » (en rouge) ainsi que pour les deux contrôles négatifs (en bleu et vert) sont distribués sous forme d'une gaussienne dont le centre correspond à peu près au centre du canal microfluidique (il y a un léger décalage expliqué ci-dessous). Cela signifie que l'écoulement est laminaire

et que la majorité des objets magnétiques passent au centre du canal. L'approximation de traiter les signaux avec une seule vitesse comme paramètre réglable semble juste (paragraphe 2.4.4).

Tableau 4.3 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons tests et les témoins négatifs avec les billes Dynabeads MyOne de 1 µm

	Sensibilité des capteurs GMR (%/mT)		Bruit de sortie des capteurs GMR (mV pic à pic)		Hauteur du canal (µm)	Épaisseur SU-8 (µm)	Épaisseur NOA (µm)	Gain
	Capteur du haut	Capteur du bas	Capteur du haut	Capteur du bas				
Echantillon test (positif)	0,78	0,78	43	40	26	2	5	8600
Premier témoin négatif	0,78	0,78	61	39				
Deuxième témoin négatif	0,78	0,78	42	38				

Deux explications peuvent être données afin de comprendre le léger décalage par rapport au centre des histogrammes des Fig. 4.3A et Fig. 4.3B, la seconde nous semblant plus probable.

- 1) Les objets magnétiques ne sont pas injectés latéralement dans le canal mais par le haut et ils ne passent donc pas tout à fait au centre.
- 2) L'estimation de l'épaisseur des espaceurs n'est pas tout à fait correcte, en particulier celle de la NOA qui ne peut pas être mesurée pendant les expériences. Reprenons les équations de la Fig. 4.2 ainsi que les explications pour calculer la hauteur de passage des objets du paragraphe 2.5.7.

z_B est calculé à partir des amplitudes expérimentales $V_{pp\ haut}$ et $V_{pp\ bas}$ des signaux qui constituent une coïncidence.

Les champs dipolaires haut et bas sont proportionnels à ces tensions expérimentales. Une erreur sur l'épaisseur des espaceurs sera rectifiée en choisissant le z_B qui permet d'avoir les hauteurs h_{haut} (ou h_{bas}) permettant d'ajuster correctement les signaux expérimentaux. Les histogrammes représentant les positions des objets dans le canal seront donc légèrement décentrés. Dans le cas des Fig. 4.3A et Fig. 4.3B, l'équation $h_{haut} = h - z_B + Z_{esp-haut}$ montre que nous avons dû surestimer l'épaisseur de NOA ($Z_{esp-haut}$) puisque l'histogramme est centré à 15 µm et non à 13,5 µm (en supposant que nous avons correctement déterminé l'épaisseur de SU-8 2002, $Z_{esp-bas}$).

Ensuite, les Fig. 4.3C et Fig. 4.3D montrent l'histogramme du nombre de coïncidences en fonction du nombre de billes magnétiques présentes par objet détecté (objets détectés = agrégats pour les contrôles négatifs, agrégats et cellules marquées dans l'échantillon « test positif »). L'échantillon « test positif » (histogramme rouge) contient la même concentration de billes $1,5 \times 10^7$ billes/mL que les échantillons

négatifs. Dans le cas théorique d'un marquage parfait avec occupation stérique complète des 10^5 NS1, environ 150 billes se lieront par cellule (paragraphe 3.3.1.1). Cela signifierait que toutes les billes ont été couplées aux cellules. Or une étude visuelle par microscopie optique (Fig. 3.2, paragraphe 3.3.1.1) a montré que les cellules NS1 sont marquées par 50 billes en moyenne, avec une distribution entre 20 et 80 billes. Ces photos montrent également que la majorité des agrégats contient moins de 10 billes et que les agrégats de plus de 25 billes sont des événements rares. Comme le montre les courbes de champ dipolaire, du fait des LOD imposées pour la validation des coïncidences, les agrégats de moins de 10 billes ne peuvent pas être détectés par les capteurs GMR (Fig. 4.1).

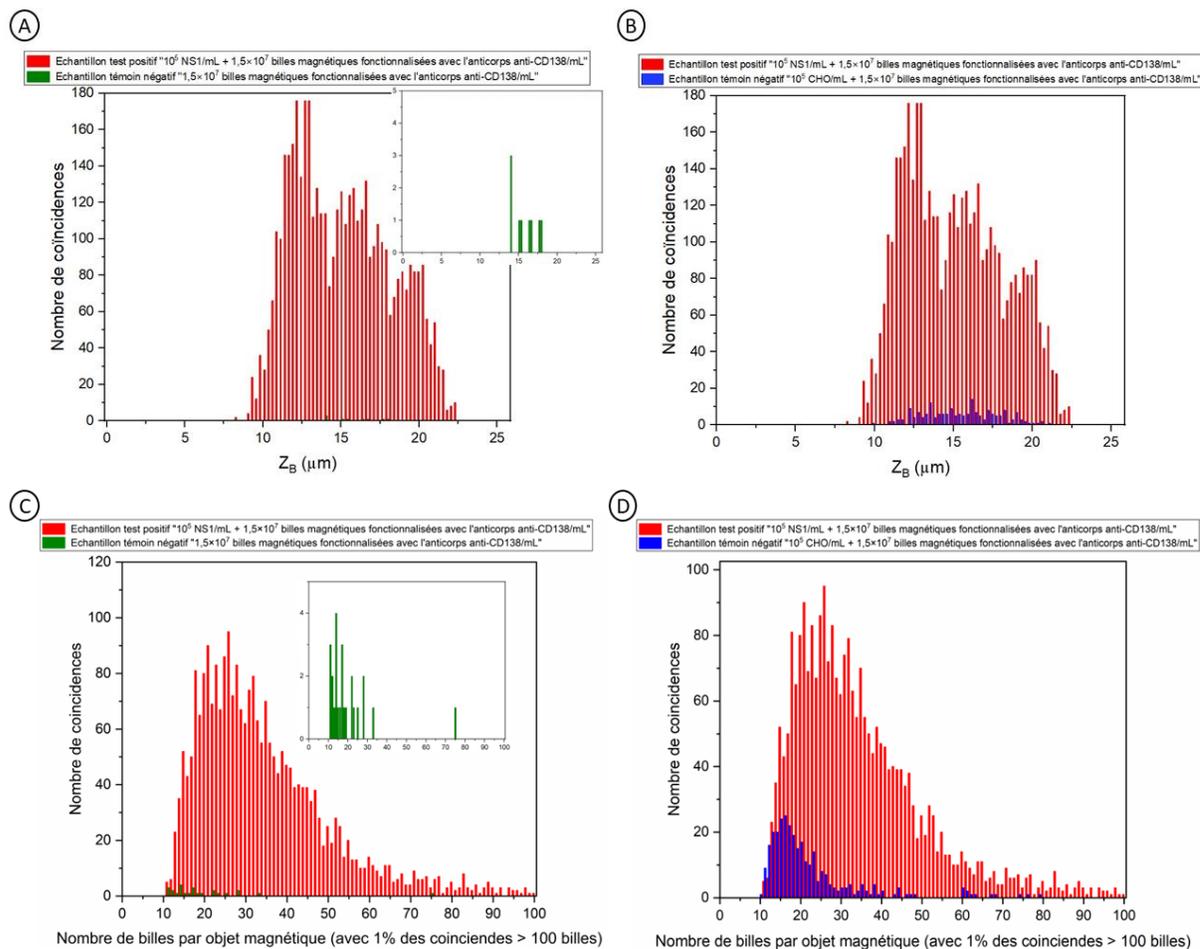


Fig. 4.3 - Histogramme du nombre de coïncidences en fonction de la hauteur de passage dans le canal microfluidique Z_B (A et B, en haut) ou en fonction du nombre de billes détectées par objet magnétique (C et D, en bas) pour des expériences réalisées avec des billes Dynabeads MyOne de 1 μm

Nombre de coïncidences obtenues avec la biopuce GMR à deux étages après passage de 200 μL d'une solution de 1 mL de milieu de culture contenant $1,5 \times 10^7$ billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec: A, B, C et D) 10^5 cellules NS1 (histogrammes rouges), B et D) 10^5 cellules CHO (histogrammes bleus) ou A et C) en absence de cellules (billes magnétiques seules en milieu de culture, histogrammes verts). Pour des raisons de lisibilité, les deux histogrammes Fig. 4.3C et Fig. 4.3D ont été tracés pour un nombre de billes par objets magnétiques (cellules ou agrégats) n'excédant pas 100 billes, même si les données rapportent que certains objets magnétiques (agrégats ou cellules) sont labélisés jusqu'à 200 billes (% de ces coïncidences extrêmes indiqué entre parenthèses).

Pour cette raison et grâce à une taille modérée des agrégats, deux populations distinctes sont observées respectivement pour l'échantillon « test positif » (histogramme en rouge, avec en majorité > à 25 billes par objet, autrement dit correspondant très certainement à des cellules magnétiquement marquées) et pour les

témoins négatifs (histogrammes en bleu et vert, avec en majorité < à 25 billes par objet, i.e. des agrégats de billes). En d'autres termes, dans l'échantillon « test positif » (histogramme rouge **Fig. 4.3C** et **Fig. 4.3D**) contenant autant de cellules cibles NS1 que de cellules non pertinentes CHO dans le 2^e témoin négatif (histogramme bleu, **Fig. 4.3D**) et autant de billes magnétiques Dynabeads MyOne fonctionnalisées que dans les 2 témoins négatifs, on retrouve quelques agrégats de 10 à 25 billes (en moyenne), mais une nouvelle population d'événements apparaît constituée d'objets supérieurs à 25 billes, correspondant très certainement aux cellules NS1 spécifiquement marquées par les billes magnétiques. Ces données sont tout à fait cohérentes avec les observations microscopiques de la **Fig. 3.2, paragraphe 3.3.1.1**.

En conclusion, les objets magnétiques de l'échantillon « test positif », qui génèrent des coïncidences au centre du canal (**Fig. 4.3**, histogramme rouge) avec les critères d'amplitude imposés, sont très certainement majoritairement des cellules NS1 spécifiquement marquées par plus de 25 billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées et minoritairement quelques agrégats ou cellules NS1 faiblement marquées (< 25 billes).

Pour cette expérience, le nombre de coïncidences pour le premier contrôle négatif représente moins de 0,5 % du nombre de coïncidences obtenu pour l'échantillon « test positif », correspondant donc à une spécificité de 99,5 %. Concernant, le nombre de coïncidence du deuxième contrôle négatif, il représente seulement 8 % du nombre de coïncidences obtenu pour l'échantillon positif, correspondant à une spécificité de 92 %. Cette différence entre les deux tests négatifs peut provenir de deux phénomènes hypothétiques, i) de l'encombrement des cellules non pertinentes dans la solution et donc du manque de place pour les billes magnétiques qui finissent par s'agréger et ii) d'une accroche non spécifique des billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées aux cellules CHO.

4.2.1.3. Evaluation de la sensibilité du test de détection

Après avoir montré la bonne spécificité de détection des cellules NS1 avec la biopuce combinée aux billes Dynabeads MyOne fonctionnalisées (i.e. on sait différencier les cellules NS1 des agrégats de billes), il est crucial d'évaluer la sensibilité du test.

Pour évaluer cette sensibilité de détection de la biopuce au moyen des billes magnétiques, une gamme de concentration en cellules NS1 (de 10^2 à 10^5 cellules/mL en milieu de culture) magnétiquement marquées par les billes Dynabeads fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 a été analysée, en plus des témoins négatifs précédents, au cours de plusieurs expériences indépendantes réalisées sur des biopuces GMR différentes possédant des caractéristiques différentes (**Tableau 4.2**).

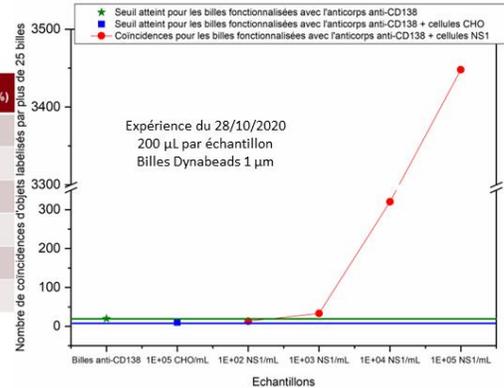
Si on se réfère à la gaussienne des histogrammes des témoins négatifs (**Fig. 4.3C** et **Fig. 4.3D**), la majorité des agrégats de billes, détectables avec les critères de LOD imposés pour la détection, semblent contenir moins de 25 billes (ceux de moins de 10 billes n'apparaissant pas sur l'histogramme avec les LOD que nous avons imposées). La spécificité du test étant d'autre part tout à fait honorable, nous allons considérer qu'au-delà de 25 billes, les objets détectés sont très probablement des cellules labélisées par des billes magnétiques (et très peu probablement de gros agrégats de billes, voir histogrammes de la **Fig. 4.3C** et **Fig. 4.3D** montrant que de tels événements sont très occasionnels (< 10 %)). Inversement, en dessous de 25 billes, nous allons considérer qu'il y a une forte probabilité que les objets détectés soient des agrégats plutôt que des cellules très peu labélisées, comme le suggère d'ailleurs les observations microscopiques (98% des cellules marquées le sont avec plus de 7 billes, **Fig. 3.2, paragraphe 3.3.1.1**).

Ainsi, et pour s'affranchir d'un maximum d'agrégats de billes, nous avons retraité les résultats obtenus en fixant un seuil à 25 billes : seules les coïncidences d'objets magnétiques contenant plus de 25 billes sont considérées comme des cellules cibles NS1. C'est de cette façon que nous avons évalué la sensibilité de détection de la biopuce, en traçant la courbe du nombre de coïncidences d'objets labélisés par plus de 25

billes en fonction de la concentration en cellules NS1 (Fig. 4.4), pour 4 expériences présentées sur le Tableau 4.2.

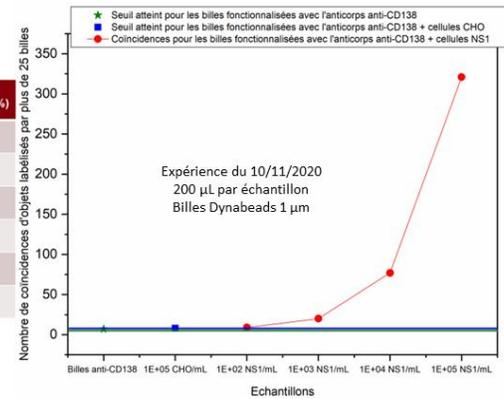
(A)

Echantillons	Nombre de cellules à détecter dans 200 µL	Coïncidences détectées	Coïncidences > à 25 billes	Pourcentage de cellules récupérées (%)
10 ² NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138	20	107	13	65
10 ³ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138	200	241	33	17
10 ⁴ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138	2000	1134	320	16
10 ⁵ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138	20000	5257	3448	17
10 ⁵ CHO/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138		203	10	
1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138		159	20	



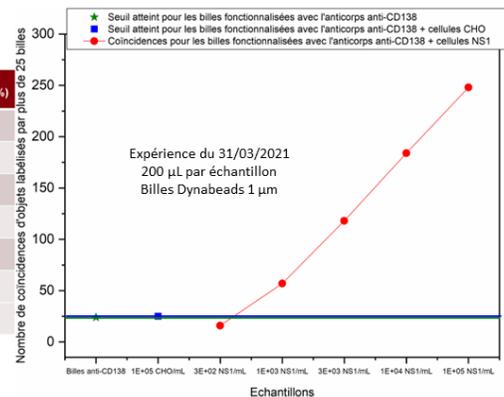
(B)

Echantillons	Nombre de cellules à détecter dans 200 µL	Coïncidences détectées	Coïncidences > à 25 billes	Pourcentage de cellules récupérées (%)
10 ² NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	20	998	9	45
10 ³ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	200	927	20	10
10 ⁴ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	2000	741	77	4
10 ⁵ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	20000	743	321	2
10 ⁵ CHO/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138		70	8	
1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138		102	7	



(C)

Echantillons	Nombre de cellules à détecter dans 200 µL	Coïncidences détectées	Coïncidences > à 25 billes	Pourcentage de cellules récupérées (%)
3.10 ⁵ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	60	29	16	27
10 ³ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	200	77	57	29
3×10 ⁴ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	600	162	118	20
10 ⁴ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	2000	229	184	9
10 ⁵ NS1/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	20000	500	248	1
10 ⁵ CHO/mL + 1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138		96	25	
1,5×10 ⁷ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138		48	24	



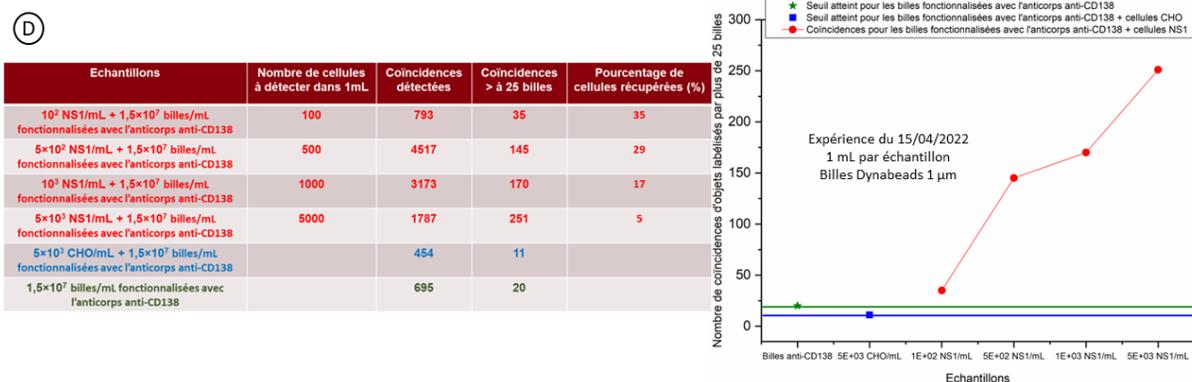


Fig. 4.4 - Evaluation de la sensibilité de détection des cellules NS1 par la biopuce GMR avec des billes Dynabeads MyOne 1 µm fonctionnalisées anti-CD138

A : Expérience du 28-10-20 avec une sensibilité entre 10² et 10³ cellules NS1/mL. **B :** Expérience du 10-11-20 avec une sensibilité entre 10² et 10³ cellules NS1/mL. **C :** Expérience du 31-03-21 avec une sensibilité entre 3.10² et 10³ cellules NS1/mL. **D :** Expérience du 15-04-22 avec une sensibilité de 10² cellules NS1/mL.

Dans la **Fig. 4.4** :

- Coïncidences détectées = nombre total de coïncidences détectées supérieures à 10 billes (limite de détectabilité de la biopuce GMR à deux étages (**Fig. 4.1**) correspondant à des agrégats ou des cellules magnétiquement marquées).
- Coïncidences > à 25 billes = coïncidences d’objets magnétiques contenant un nombre de billes (> 25) supérieur au seuil au-delà duquel il est fortement probable que les objets magnétiques soient des cellules magnétiquement marquées (seuil déterminé lors de l’étude de spécificité (**Fig. 4.3**)).
- Pourcentage de cellules récupérées = nombre de coïncidences détectées avec plus de 25 billes / nombre attendu de cellules NS1 dans le volume analysé par la biopuce GMR.

En vert, il s’agit du seuil correspondant au nombre de coïncidences enregistrées pour l’échantillon témoin de billes seules, autrement dit aux agrégats de plus de 25 billes. En bleu, il s’agit du seuil correspondant aux coïncidences enregistrées pour le deuxième échantillon témoin (avec cellules CHO), autrement dit aux agrégats de plus de 25 billes mais en présence de cellules non pertinentes CHO. En rouge, il s’agit du nombre de coïncidences enregistrées pour chacune des différentes concentrations en cellules NS1 (en présence de la même concentration en billes fonctionnalisées par l’anticorps anti-CD138 que pour les contrôles négatifs soit 1,5 × 10⁷ billes/mL).

Pour les trois premières expériences **Fig. 4.4A, B** et **C**, 200 µL de chaque échantillon a été analysé dans la biopuce pour des questions de durée d’expérience (200 µL met environ 10 minutes à passer dans le canal microfluidique contre 45 minutes pour un échantillon de 1 mL). Cependant, la dernière expérience (**Fig. 4.4D**) a été réalisée avec des échantillons de 1 mL en quête d’un gain de sensibilité.

Les trois premières expériences s’étendent sur une gamme de concentration allant de 10² à 10⁵ NS1/mL, avec un témoin négatif contenant nécessairement 10⁵ CHO/mL (**Fig. 4.4A, B** et **C**). En revanche, pour la dernière expérience basée sur un plus grand volume d’analyse (pour une meilleure sensibilité), la gamme de concentration a été réduite, de 10² à 5 × 10³ NS1/mL, et c’est pourquoi sur la **Fig. 4.4D** la concentration en cellules CHO n’est que de 5 × 10³ cellules/mL.

On remarque que pour ces quatre expériences, les coïncidences d'objets labélisés par plus de 25 billes pour les contrôles négatifs sont assez rares.

En moyenne, seulement 14 coïncidences d'objets marqués par plus de 25 billes ont été enregistrées pour 200 μL et 11 pour 1 mL de témoin négatif contenant des cellules CHO en présence de billes magnétiques (moyennes différentes car ces quatre expériences n'ont pas la même concentration en cellules non pertinentes). Autrement dit, ce sont de gros agrégats (> 25 billes) ou des cellules CHO fortement labélisées de façon non spécifique.

Un nombre moyen de 14 coïncidences d'objets marqués par plus de 25 billes a été enregistré pour 200 μL de témoin négatif contenant uniquement $1,5 \times 10^7$ billes fonctionnalisées par mL (moyenne calculée pour les quatre expériences en ajustant le nombre de coïncidences sur 200 μL pour l'expérience de la **Fig. 4.4D**).

Ce sont des seuils relativement faibles et améliorables par nos recherches de diminution de l'état d'agrégation des billes (**paragraphe 3.4.2.3**).

Concernant la sensibilité de détection du test, elle correspond à la plus petite concentration de cellules NS1 pour laquelle la biopuce est capable de détecter un nombre de coïncidences supérieur à celui enregistré pour les deux témoins négatifs réalisés dans les mêmes conditions.

- Pour un volume de 200 μL passant en 10 minutes dans la biopuce, elle est entre 10^2 et 10^3 cellules NS1/mL (**Fig. 4.4A, B et C**). On peut toutefois remarquer que la quantité de cellules NS1 détectées (coïncidences supérieures à 25 billes) ne correspond pas et est bien inférieure à la quantité de cellules attendues dans les échantillons (voir les pourcentages de cellules récupérées indiqués dans les tableaux). On peut noter que cet écart est d'autant plus marqué que la concentration en cellules NS1 est importante. Ainsi pour les échantillons contenant 10^5 cellules NS1/mL, 20 000 cellules sont attendues dans 200 μL d'échantillon introduit dans la biopuce. Or, seulement 1 à 17 % de ces cellules sont détectées par la biopuce. Pour une concentration de 10^3 NS1/mL, ce pourcentage monte et varie entre 10 et 29 %. Quant aux concentrations inférieures à 10^3 NS1/mL, il est possible de récupérer en moyenne 40 % des objets biologiques. Les origines de cette perte font l'objet d'une explication dans le **paragraphe 4.2.1.4** et des optimisations seront entreprises pour en réduire la portée. Il est toutefois important de noter que cette plage dynamique (certes, à ce jour limitée) est toutefois favorable à l'utilisation de la biopuce en tant qu'outil de diagnostic précoce, dont l'objet d'étude est la mesure de très faibles concentrations.
- La sensibilité de détection de la biopuce semble pouvoir être améliorée en augmentant le volume d'échantillon analysé (mais pour une durée d'analyse également plus longue). En effet, pour un volume d'échantillon de 1 mL passant en 45 minutes environ dans la biopuce, la sensibilité a une valeur de 10^2 NS1/mL (**Fig. 4.4D**). Ces résultats restent toutefois à être confirmés par d'autres expériences.

Une autre solution envisagée est la concentration de nos échantillons dans un volume de 200 μL . Les premiers essais n'ont pas été concluants. Il faudra s'assurer qu'il ne s'agit pas de « l'effet crochet ». En biologie, au-delà d'une certaine concentration, les effets attendus ne se produisent plus.

4.2.1.4. Objets biologiques non détectés

Comme vu précédemment (**Fig. 4.4**), on ne parvient pas à détecter l'ensemble des objets biologiques présent dans chaque échantillon introduit dans la biopuce : il existe une perte d'autant plus prononcée que la concentration en cellules est importante.

Afin de vérifier que cette perte ne provient pas d'un engorgement des cellules dans les tubulures microfluidiques, les objets biologiques ont été récupérés et comptés au TC20 et à la cellule de Malassez sur les concentrations les plus élevées (10^5 et 10^4 NS1) à la fin d'une expérience. Sachant que le TC20 a une limite de détection entre 10^4 et 10^7 cellules/mL et la cellule de Malassez, quant à elle, possède une limite de détection en dessous de 10^4 cellules/mL.

D'après le **Tableau 4.4**, il y a une perte de cellules dans les tubulures (cette perte peut varier selon les expériences, s'il y a des engorgements ou non). Cependant si les cellules restent dans les tubulures de sortie (l'échantillon n'a peut-être pas été correctement récupéré), elles n'ont pas été récupérées mais elles ont quand même été détectées.

Tableau 4.4 - Comptage des cellules NS1 (10^4 et 10^5 cellules/mL) avant et après l'expérience

Concentrations	Avant l'expérience (NS1/mL)		Après l'expérience (NS1/mL)		Cellules récupérées (%)	
	TC20	Malassez	TC20	Mallasez	TC20	Malassez
10^5 NS1/mL + $1,5 \times 10^7$ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	$1,34 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$4,83 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	36	29
10^4 NS1/mL + $1,5 \times 10^7$ billes/mL fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138	$< 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$< 10^4$	$1 \cdot 10^3$	/	13

Le fait que tous les objets ne soient pas détectés peut également s'expliquer par des phénomènes de deux natures : d'ordre biologique et d'ordre magnétique.

4.2.1.4.1. Explications biologiques

- Certaines cellules peuvent ne pas être labélisées par les billes magnétiques. Une étude statistique, réalisée sur des dizaines de photos prises au microscope et analysées à l'aide des logiciels ImageJ et Paintshop pro, révèle qu'en moyenne 7 % des cellules NS1 se retrouvent sans bille à leur surface après 2 h d'immunocapture à 20°C sous agitation (**Fig. 4.5a**).
- Certaines cellules sont très peu labélisées et se retrouvent avec moins de 25 billes à leur surface (**Fig. 4.5b**) alors qu'une cellule bien labélisée compte en moyenne 50 billes à sa surface (**Fig. 3.5**).
- Certaines cellules ne survivent pas à la préparation de l'échantillon et, en particulier, aux 2 h d'immunocapture sous agitation, il y a donc dans la solution d'échantillon des cellules mortes qui sont potentiellement peu ou pas labélisées (**Fig. 4.5c**).
- Les cellules magnétiquement labélisées peuvent facilement former des clusters de cellules. En effet, les billes magnétiques fonctionnalisées possèdent plusieurs anticorps à leur surface et

peuvent donc immunocapturer simultanément plusieurs cellules. Chaque cellule NS1 possède en outre plusieurs récepteurs CD138 à sa surface [1], ce qui permet l'accrochage simultané de plusieurs billes fonctionnalisées en surface de chaque cellule. D'autre part, les billes peuvent également former des agrégats entre elles et donc une cellule labélisée peut être collée à d'autres cellules par agrégation des billes magnétiques. Ces clusters de cellules sont d'autant plus fréquemment observés au microscope que la concentration en cellules est importante, et ils sont très souvent visibles pour des concentrations supérieures à 10^4 NS1/mL (Fig. 4.5d). Un tel cluster de cellule est détecté comme un objet magnétique unique par la biopuce, comme expliqué dans le paragraphe 4.2.1.4.2 suivant.

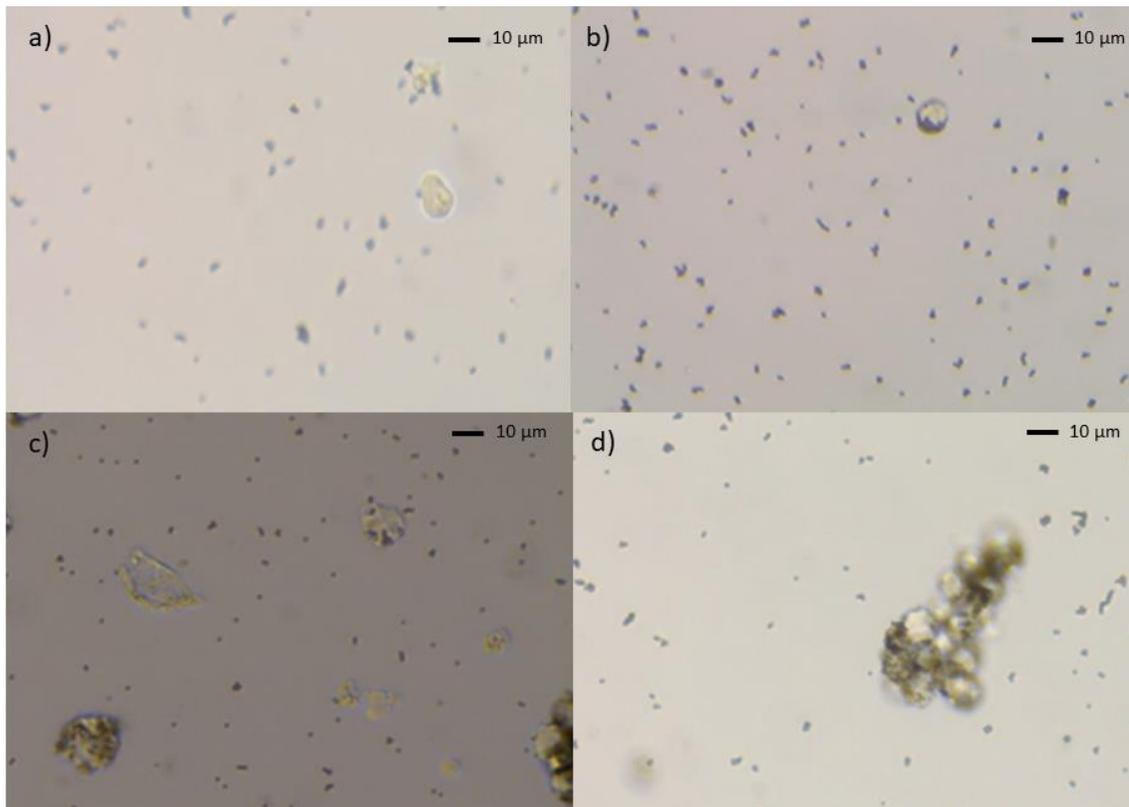


Fig. 4.5 - Illustrations photographiques (microscope optique) de causes biologiques des cellules non détectables par la biopuce GMR

a) cellule non labélisée, b) cellule peu labélisée (< à 25 billes Dynabeads MyOne), c) cellule morte, d) cluster de cellules détecté comme un seul objet magnétique par la biopuce.

4.2.1.4.2. Explications magnétiques

L'arrangement des cellules lorsqu'elles passent groupées devant les capteurs GMR dans le canal microfluidique peut également jouer sur la détectabilité de chacune d'entre elle. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 -, le laboratoire sur puce permet la détection dynamique d'objets magnétiques un par un. Il est cependant important de connaître l'influence du passage simultané de cellules labélisées dans le canal microfluidique.

Dans le cas d'un échantillon contenant une concentration C d'objets biologiques définie par l'équation (Eq. 4.1) :

$$C = \frac{N_{cellules}}{Vol_{\text{échantillon}}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Répartis de manière homogène dans la matrice, le nombre de cellules labélisées qui circulent dans le canal microfluidique $N_{Cellules}^{Canal}$ de volume V_{canal} est défini par l'équation (Eq. 4.2) :

$$N_{Cellules}^{Canal} = C \times V_{canal} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Ainsi, pour une concentration d'échantillon de 10^5 NS1/mL, pour un laboratoire sur puce ayant une hauteur de $26 \mu\text{m}$, une largeur de $100 \mu\text{m}$ et une longueur de $10^4 \mu\text{m}$, $V_{canal} = 2,6 \times 10^{-2} \mu\text{L}$.

Par conséquent, $N_{Cellules}^{Canal} = 2,6$.

Cela signifie que, dans un échantillon de forte concentration avec une distribution uniforme de cellules, les objets biologiques ne s'écoulent pas un par un dans le canal. Or pour de plus faibles concentrations, si nous prenons une concentration de 10^3 NS1/mL par exemple, les objets biologiques s'écoulent, cette fois, un par un dans le canal ($N_{Cellules}^{Canal} = 0,026$). En réalité, même si l'échantillon est agité pour maintenir la distribution la plus homogène possible, il y a toujours une possible sédimentation des cellules et une inhomogénéité de leur distribution dans l'échantillon. En effet :

- Certaines cellules peuvent être très proches l'une de l'autre lorsqu'elles passent entre les deux capteurs GMR, ce qui ne permet pas au capteur de les différencier individuellement. Les cellules sont donc considérées comme un objet unique. Des simulations ont montré qu'il fallait une distance minimum de $30 \mu\text{m}$ afin d'obtenir des signaux distincts pour chacune des deux cellules. C'est une petite distance comparée à la longueur du canal ($10^4 \mu\text{m}$) (Fig. 4.6a et Fig. 4.6b).
- Des cellules peuvent également passer l'une au-dessus de l'autre. Dans ce cas, un objet unique est également détecté. Cette configuration est assez rare en raison de la taille des cellules ($6 \mu\text{m}$ en moyenne) par rapport à la hauteur du canal (ex : $26 \mu\text{m}$) (Fig. 4.6c).
- Comme expliqué précédemment, lors du traitement des données, nous imposons une limite de détection supérieure à deux fois le bruit sur l'un des deux signaux, ce qui empêche de voir certaines coïncidences. Et donc certains objets biologiques ne sont pas détectés.

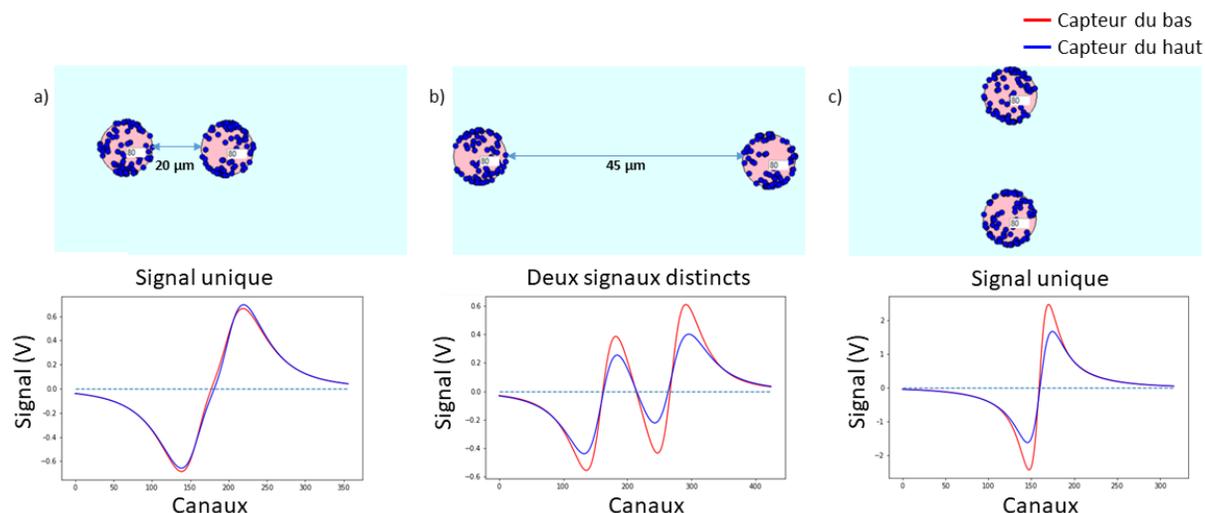


Fig. 4.6 - Trois simulations de signaux émis par deux cellules labélisées par 80 billes, situées à différentes positions l'une par rapport à l'autre dans le canal microfluidique, sont présentées

Sur les figures a et b, les deux cellules sont au centre du canal, ce qui est une hypothèse probable d'après les Fig. 4.3A et B. Sur la figure a, les cellules sont séparées de 20 μm. Leurs signaux sont confondus. Sur la figure b, les deux cellules sont séparées par 45 μm et leurs signaux sont parfaitement distincts. Les signaux sont confondus lorsque la distance séparant les cellules est inférieure à 30 μm. Sur la figure c, deux cellules circulant l'une au-dessus de l'autre, ont un signal unique.

En conclusion, de nombreux phénomènes peuvent expliquer l'absence de détection de cellules par la biopuce. Ceux-ci peuvent toutefois faire l'objet de mesures complémentaires pour permettre une meilleure détectabilité, et donc pour atteindre une meilleure sensibilité. Nous en débattons plus amplement dans la partie discussion ([paragraphe 4.3](#)).

4.2.2. Détection GMR des cellules NS1 labélisées avec les billes magnétiques Micromod 500 nm

4.2.2.1. Données préliminaires

Bien que nous ayons pu évaluer la spécificité et la sensibilité de la biopuce GMR à deux étages avec les billes Dynabeads MyOne de 1 μm. Il a été décidé de réaliser quelques expériences avec des billes Micromod 500 nm malgré leurs défauts ([paragraphe 3.3.1.2](#)).

En effet, en utilisant des billes de diamètre plus petit, nous espérons encore augmenter le ratio entre le nombre de billes labélisant les cellules et le nombre de billes contenu dans les agrégats. Ainsi, la spécificité et la sensibilité du test pourraient être augmentées davantage.

Afin d'évaluer ces deux critères avec les Micromod 500 nm, trois expériences ont été réalisées ([Tableau 4.5](#)), mais seulement deux d'entre elles sont exploitables car complètes (i.e. comprenant les acquisitions et résultats pour les échantillons tests et pour les témoins négatifs).

Au préalable, des simulations du champ dipolaire émis et produit simultanément sur les capteurs haut et bas par des objets magnétiques contenant un nombre variable de billes Micromod 500 nm en fonction de leur hauteur de passage dans le canal microfluidique ont été réalisées ([Fig. 4.7](#)).

Tableau 4.5 - Paramètres des différentes expériences avec les billes Micromod 500 nm

Date de l'expérience	Nom de la biopuce	Hauteur du canal (µm)	Épaisseur SU-8 (µm)	Épaisseur NOA81 (µm)	Sensibilité des capteurs (% /mT)	Bruit moyen capteur haut (mV)	Bruit moyen capteur bas (mV)	Volume des échantillons (µL)
16-03-2021	C2E14	23,5	2,2	5	0,78	51	31	200
26-03-2021	C2E14	23,5	2,2	5	0,81	38	32	200

Comme pour les Dynabeads MyOne, les coïncidences résultantes comprennent un signal dont l'amplitude est supérieure à deux fois la limite de détection (LOD) d'un capteur et l'amplitude du second signal a été fixée à une fois la limite de détection (LOD) c'est-à-dire à un rapport signal sur bruit (SNR) de 1. Les objets magnétiques qui génèrent des coïncidences avec les critères d'amplitude imposés, sont des objets magnétiques qui contiennent au moins 20 billes comme le prédit le calcul des champs dipolaires respectivement émis par les capteurs du haut et du bas (Fig. 4.7).

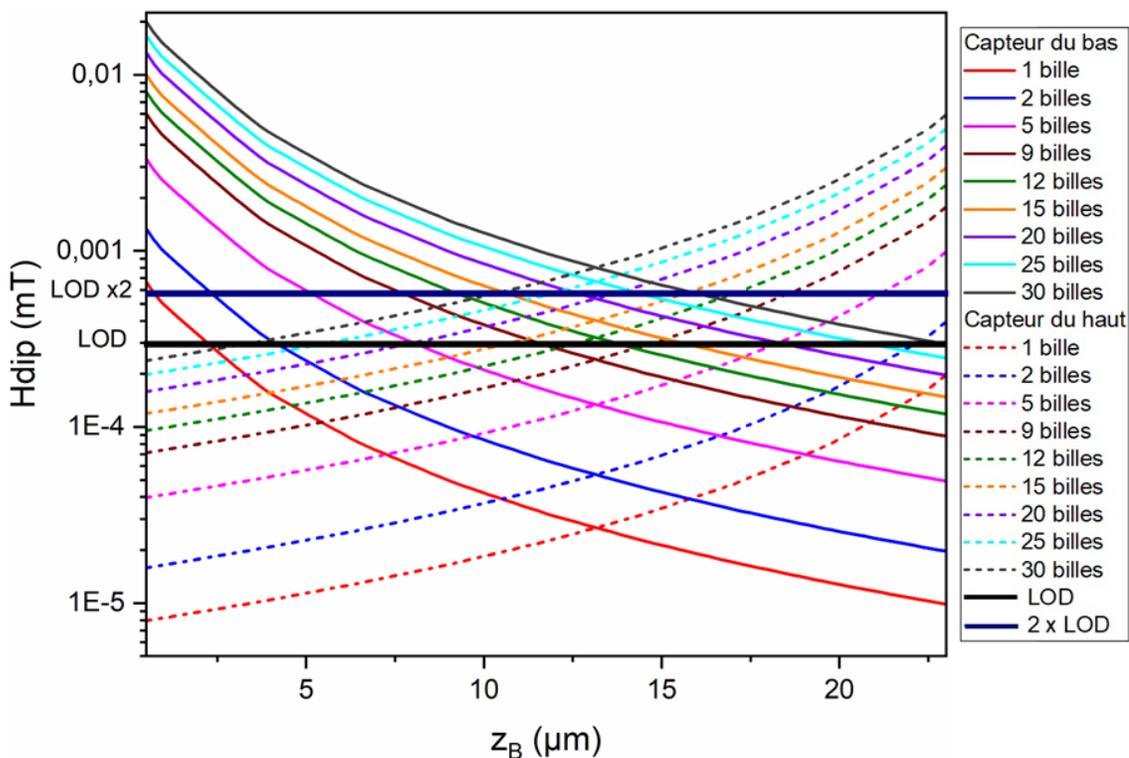


Fig. 4.7 - Champ dipolaire théorique mesuré simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (trait pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Micromod de 500 nm en fonction de leur hauteur de passage z_B (23,5 µm) dans le canal

La limite de détection LOD est indiquée par un trait noir gras (paragraphe 1.4.6.5).

La plupart des objets magnétiques donnant lieu à une coïncidence passent au centre du canal microfluidique. Comme expliqué précédemment, une légère dissymétrie est visible du fait que les espaces du haut et du bas n'ont pas la même épaisseur comme le montre les équations de la [Fig. 4.2](#).

4.2.2.2. Evaluation de la spécificité du test

Pour évaluer la spécificité de détection de la biopuce au moyen des billes magnétiques Micromod 500 nm, nous avons analysé et comparé trois échantillons :

- Un échantillon « test positif » de 200 μ L contenant 10^5 NS1/mL labélisées par des billes fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138,
- Et deux échantillons « témoins négatifs » de 200 μ L chacun. Le premier contrôle négatif contient uniquement des billes superparamagnétiques (Micromod 500 nm) fonctionnalisées par l'anticorps spécifique anti-CD138 en milieu de culture à la même concentration que dans l'échantillon « test positif » (10^8 billes/mL). Le deuxième contrôle négatif contient les mêmes billes, à la même concentration, mais en présence de 10^5 cellules CHO non pertinentes par mL.

La sensibilité et le bruit expérimental des deux capteurs GMR intégrés dans la biopuce sont déterminés, comme expliqué dans le [chapitre 2](#) -, avant l'écoulement de chaque échantillon dans le canal. Les valeurs sont indiquées dans le [Tableau 4.6](#).

Tableau 4.6 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons tests et les témoins négatifs avec les billes Micromod 500 nm

	Sensibilité des capteurs GMR (%/mT)		Bruit de sortie des capteurs GMR (mV pic à pic)		Gain
	Capteur du haut	Capteur du bas	Capteur du haut	Capteur du bas	
Echantillon test (positif)	0,78	0,78	41	27	8600
Premier témoin négatif	0,78	0,78	38	33	
Deuxième témoin négatif	0,78	0,78	70	33	

Le nombre de coïncidences enregistré par la biopuce est analysé pour chacun des trois échantillons afin d'évaluer l'intérêt et la spécificité du test. Parmi les trois expériences réalisées avec les billes Micromod 500 nm, celle du 16 mars 2021 a été choisie à titre d'exemple pour les analyses présentées en [Fig. 4.8](#).

Cette figure présente les paramètres extraits du traitement du signal détaillé dans le [chapitre 2](#) -, obtenus pour l'échantillon test et les deux contrôles négatifs. Comme énoncé précédemment, les coïncidences résultantes comprennent un signal dont l'amplitude est supérieure à deux fois la limite de détection (LOD) et l'amplitude du second signal a été fixée à une fois la limite de détection (LOD) c'est-à-dire à un rapport signal sur bruit (SNR) de 1. Les [Fig. 4.8A](#) et [Fig. 4.8B](#) montrent le nombre de coïncidences en fonction de la hauteur d'écoulement z_B (23,5 μ m : hauteur totale du canal) obtenu pour les trois échantillons. On peut voir que la plupart des objets magnétiques donnant lieu à une coïncidence pour l'échantillon « test positif »

(rouge) ainsi que pour les deux contrôles négatifs (bleu et vert) passent au centre du canal microfluidique. Le léger décalage est expliqué dans le [paragraphe 4.2.1.2](#).

Ensuite, les [Fig. 4.8C](#) et [Fig. 4.8D](#) montrent l'histogramme du nombre de coïncidences en fonction du nombre de billes magnétiques présentes par objet détecté (objets détectés = agrégats pour les témoins négatifs, agrégats et cellules marquées pour l'échantillon « test positif »). L'échantillon « test positif » (histogramme rouge) contient la même concentration surnuméraire de billes 10^8 billes/mL que les échantillons négatifs. Dans le cas théorique d'un marquage parfait avec occupation stérique complète des 10^5 NS1, environ 600 billes se lieront par cellule. Seules 6.10^7 billes sont donc utilisées. Cela signifie qu'il y a encore 4×10^7 billes surnuméraires dans l'échantillon. En fait, ce nombre est encore plus élevé puisqu'une étude visuelle par microscopie optique ([Fig. 3.3, paragraphe 3.3.1.2](#)) a montré que les cellules NS1 sont marquées en moyenne seulement par une trentaine de billes, avec une distribution entre 10 et 80 billes. De plus, en raison de la forte propension des billes Micromod 500 nm fonctionnalisées à s'agréger (agrégats de plus de 200 billes, [Fig. 4.8C](#) et [Fig. 4.8D](#), bleu et vert), les deux populations censées être observées distinctement - agrégats de billes présents dans les deux échantillons témoins négatifs (en bleu et vert) et les cellules marquées magnétiquement mélangées aux billes surnuméraires dans l'échantillon « test positif » (en rouge) – ont tendance à se confondre. Or, pour l'échantillon témoin négatif vert composé uniquement de billes magnétiques fonctionnalisées, on peut observer deux populations distinctes. Cela reste cependant fortement défavorable à la spécificité du test, du fait de la détection de faux positifs dus aux nombreux agrégats de billes.

Pour l'histogramme [Fig. 4.8C](#) pour un faible nombre de billes par objets magnétiques (< 50), il y a beaucoup plus de coïncidences enregistrées pour l'échantillon « test positif » (en rouge) que pour le témoin négatif (histogramme vert), ce qui correspond bien au fait que, dans l'échantillon « test positif », en plus des agrégats de billes, on trouve des cellules NS1 spécifiquement labélisées mais par un (trop) faible nombre de billes magnétiques. Les conditions d'immunocapture des cellules NS1 par les billes Micromod 500 nm fonctionnalisées ne sont certainement pas optimales (peut-être en termes de durée, de présentation/accessibilité des anticorps en surface des billes, etc.).

Enfin, une dernière observation dénote encore une spécificité médiocre du test. La [Fig. 4.8D](#) montre que l'histogramme rouge est similaire à celui de l'échantillon témoin avec cellules CHO. Ce qui pourrait démontrer, d'une part une fixation non spécifique des billes magnétiques Micromod 500 nm (fonctionnalisées anti-CD138) sur les cellules CHO non pertinentes, autrement dit, la détection de faux positifs dus à des contaminants et d'autre part la présence de nombreux agrégats dans le cas de l'échantillon « test positif » (rouge) et dans l'échantillon témoin négatif (bleu), qui nous confirmerait que les cellules sont très peu labélisées.

En bref, la spécificité de détection du test au moyen des billes Micromod 500 nm n'est pas satisfaisante puisqu'il est difficile de distinguer les cellules cibles magnétiquement marquées (événement positif) des cellules non pertinentes non spécifiquement labélisées et des agrégats de billes (faux positifs, possiblement contenus dans les échantillons positifs comme dans les témoins négatifs).

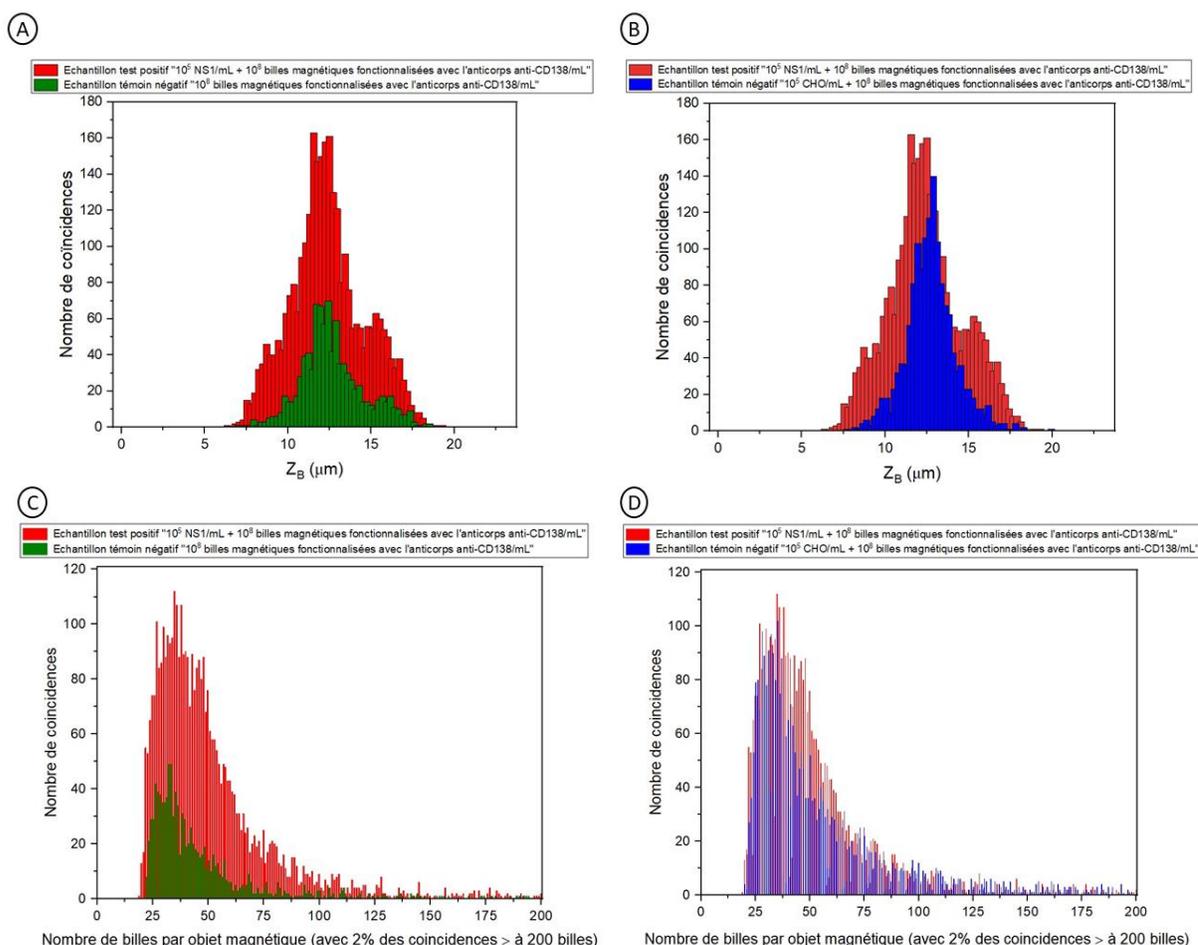


Fig. 4.8 - Histogrammes du nombre de coïncidences en fonction de la hauteur de passage dans le canal microfluidique Z_B (A et B, en haut) ou en fonction du nombre de billes détectées par objet magnétique (C et D, en bas) pour des expériences réalisées avec des billes Micromod 500 nm

Nombre de coïncidences obtenues avec la biopuce GMR à deux étages après passage de 200 μL d'une solution de 1 mL de milieu de culture contenant 10^8 billes magnétiques Micromod 500 nm fonctionnalisées avec l'anticorps anti-CD138 mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec : A, B, C et D) 10^5 cellules NS1 (histogrammes rouges), B et D) 10^5 cellules CHO (histogrammes bleus) ou A et C) en absence de cellules (billes magnétiques seules en milieu de culture, histogrammes verts).

Pour des raisons de lisibilité, les deux histogrammes Fig. 4.8C et Fig. 4.8D ont été tracés pour un nombre de billes par objets magnétiques (cellules ou agrégats) n'excédant pas 200 billes, même si les données rapportent que certains objets magnétiques (agrégats ou cellules) sont labélisés jusqu'à 1000 billes (% de ces coïncidences extrêmes indiqué entre parenthèses).

4.2.2.3. Evaluation de la sensibilité du test de détection

Pour évaluer la sensibilité de détection de la biopuce au moyen des billes Micromod 500 nm, une gamme de concentration en cellules NS1 (de 10^2 à 10^5 cellules/mL en milieu de culture) magnétiquement marquées par les billes Micromod fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 a été analysée, en plus des témoins négatifs précédents, au cours de trois expériences indépendantes (mais seulement deux interprétables) réalisées sur la même biopuce GMR dont les paramètres sont dans le **Tableau 4.5**.

Dans la **Fig. 4.9** :

- Coïncidences détectées = nombre total de coïncidences détectées supérieures à 20 billes (limite de détectabilité de la biopuce à deux étages, (**Fig. 4.7**) correspondant à des agrégats ou des cellules magnétiquement marquées).
- Coïncidences > à 50 billes = coïncidences d'objets magnétiques contenant un nombre de billes (> 50) supérieur au seuil au-delà duquel il est fortement probable que les objets magnétiques soient des cellules magnétiquement marquées (seuil déterminé lors de l'étude de spécificité (**Fig. 4.8**)).
- Pourcentage de cellules récupérées = nombre de coïncidences mesurées avec plus de 50 billes / nombre attendu de cellules NS1 dans le volume analysé par la biopuce GMR.

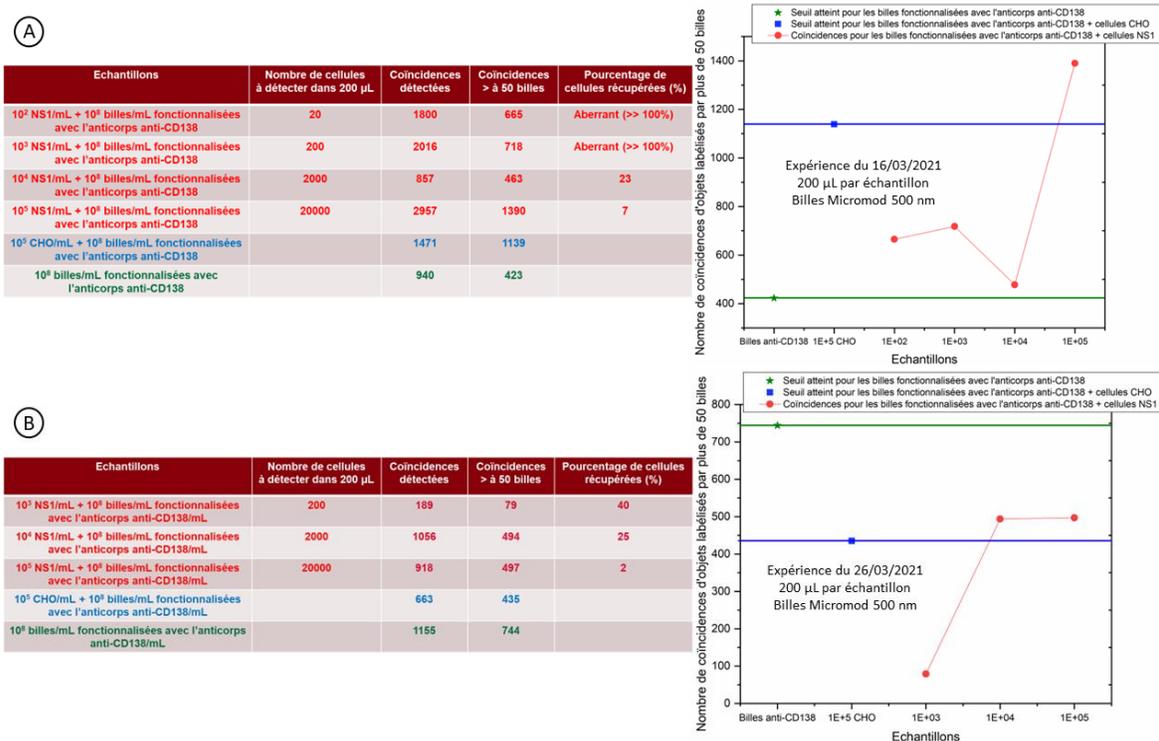


Fig. 4.9 - Evaluation de la sensibilité de détection des cellules NS1 par la biopuce GMR avec des billes Micromod 500 nm fonctionnalisées anti-CD138

A : Expérience du 16-03-21. B : Expérience du 26-03-21.

Si on se réfère à la gaussienne des histogrammes des témoins négatifs (**Fig. 4.8C** et **Fig. 4.8D**), la majorité des agrégats de billes semblent contenir entre 25 et 50 billes. Si la spécificité du test était convenable et si les agrégats de billes étaient majoritairement de petites tailles, alors nous pourrions considérer qu'au-delà de 50 billes, les objets détectés auraient une plus forte probabilité d'être des cellules labélisées par des billes magnétiques. Et qu'en dessous de 50 billes, il y aurait une plus forte probabilité que les objets détectés soient des agrégats de billes. Cette hypothèse est bien sûr fautive pour la détection avec les billes Micromod 500 nm, mais elle peut nous aider à représenter graphiquement l'ensemble des expériences réalisées avec les gammes de cellules NS1 magnétiquement marquées (**Fig. 4.9**). En vert, il s'agit du seuil correspondant au nombre de coïncidences enregistrées pour l'échantillon témoin de billes seules, autrement dit aux agrégats de plus de 50 billes. En bleu, il s'agit du seuil correspondant au nombre de coïncidences enregistrées pour le deuxième échantillon témoin (en présence de cellules non pertinentes CHO), autrement dit aux agrégats

de plus de 50 billes ou aux cellules CHO magnétiquement marquées de façon non spécifique par plus de 50 billes. En rouge, il s'agit du nombre de coïncidences enregistrées pour chacune des différentes concentrations en cellules NS1 (en présence de la même concentration en billes Micromod 500 nm fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 que pour les contrôles négatifs, soit 10^8 billes/mL).

Dans l'expérience du 16 mars 2021 (Fig. 4.9A), de très nombreux objets magnétiques (environ 700) sont détectés pour les concentrations de 10^2 et 10^3 NS1/mL, alors que théoriquement seulement 20 et 200 cellules respectivement seraient attendues. Il s'agit assurément d'agrégats de billes (faux positifs). Le nombre de coïncidences détectées semble bien plus cohérent pour les concentrations plus élevées en cellules NS1, mais seul l'échantillon contenant 10^5 NS1/mL donne un nombre (1390) de coïncidences > 50 billes, supérieur à ceux mesurés pour les deux témoins négatifs (423 pour le témoin des billes seules et 1139 pour le témoin en présence des cellules CHO). Pour cette expérience, la limite de sensibilité de la biopuce est donc proche de 10^5 cellules NS1/mL en utilisant les billes Micromod 500 nm fonctionnalisées anti-CD138.

Concernant l'expérience du 26 Mars 2021 dont les résultats sont reportés dans la Fig. 4.9B, la limite de sensibilité de la biopuce pour cette expérience n'a pas pu être déterminée expérimentalement (elle est supérieure à 10^5 cellules NS1/mL) puisque le nombre de coïncidences détectées pour l'ensemble des échantillons de la gamme de cellules NS1 est inférieur à celui mesuré pour les témoins négatifs contenant une quantité impressionnante d'objets détectés (agrégats de billes !).

Les billes Micromod 500 nm n'ont donc pas fait l'objet de beaucoup d'expériences sur la biopuce GMR au vu des résultats médiocres de sensibilité et de spécificité, dus à une trop faible labélisation des cellules cibles, une immunocapture peu spécifique et une trop forte propension des billes fonctionnalisées à s'agréger.

4.2.3. Conclusion

Tableau 4.7 - Récapitulatif et comparatif des critères ASSURED pour les expériences réalisées avec les billes Dynabeads MyOne et Micromod 500 nm sur la biopuce GMR à deux étages

Critères	Dynabeads MyOne	Micromod 500 nm
Coût	Non estimé	
Sensibilité	Entre 10^2 et 10^3 cellules/mL	$\gg 10^5$ cellules/mL
Spécificité	> à 25 billes	Aucune
Facilité d'utilisation	Oui	
Durée pour un échantillon	2 h d'immunocapture + 10 à 45 minutes pour un échantillon selon son volume	
Transportabilité	Possible	
Disponible au chevet du patient	Pas encore - stade expérimental	

4.2.4. Comparaison avec les méthodes courantes de diagnostic

4.2.4.1. Test bandelette

Des tests bandelettes ont été réalisés sur une gamme de concentrations en cellules NS1 allant de 10^2 à 10^6 NS1/mL avec un contrôle sans cellule, dans trois tampons différents et pour des membranes de porosité différentes lors de la thèse précédente [2] :

- Tampon EIA : 0,1 M tampon phosphate de potassium + 0,15 M NaCl + 0,1 % BSA + 0,01 % azide de sodium.
- 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.
- Membrane PRIMA40 de porosité proche du micromètre et membrane MDI de porosité 15 μ m.

Cependant, aucun résultat n'a pu être obtenu car les cellules étant de gros objets biologiques (6 μ m en moyenne), elles ne parviennent pas à migrer le long de la membrane de nitrocellulose et stagnent donc dans le bas de celle-ci.

4.2.4.2. ELISA

Lors de la thèse précédente [2], la détection par ELISA de cellules dans du PBS et du plasma de lapin a été réalisée. La limite de détection étant entre 2.10^3 et 2.10^4 cellules/mL selon le milieu utilisé.

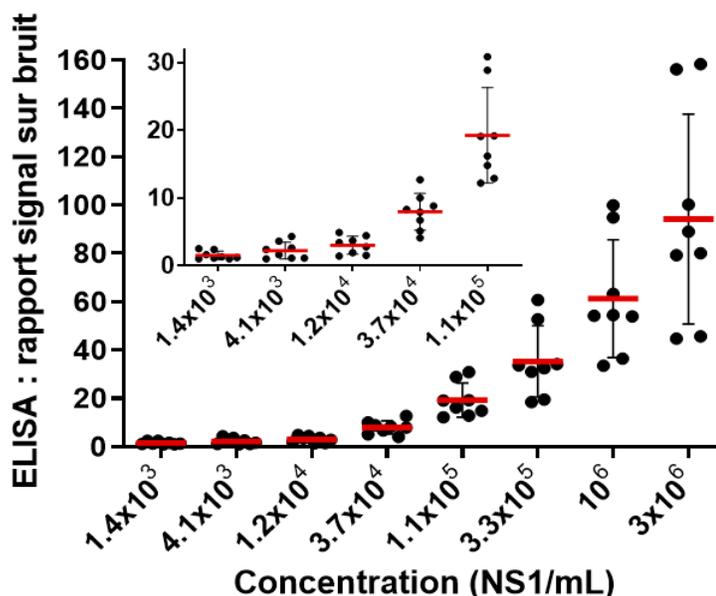


Fig. 4.10 - Rapport du signal sur bruit du test ELISA en fonction de la concentration en cellules NS1 en milieu de culture

Lors de ces travaux de thèse, des tests ELISA ont été réalisés cette fois dans du milieu de culture pour permettre une comparaison des performances de la biopuce GMR à deux étages avec la détection par ELISA dans des conditions identiques : même modèle biologique (cellule NS1), même anticorps (anti-CD138), même matrice biologique (milieu de culture).

Trois tests ELISA ont été réalisés et révélés par TMB (**Fig. 4.10** et **Tableau 4.8**) et trois tests ont été réalisés et révélés par le réactif d'Ellman. Seuls les tests ELISA révélés par TMB sont montrés ici, ceux révélés par le réactif d'Ellman sont légèrement moins sensibles. Il a pu être observé qu'entre 200 et 400 ng/mL d'anticorps anti-CD138 biotinylés, il ne semble pas y avoir de différence significative.

Tableau 4.8 - Limite de détection et de quantification des tests ELISA en milieu de culture

La LoD est la plus petite concentration en cellules NS1 que l'ELISA est capable de détecter et la LoQ est la plus petite concentration en cellules NS1 pour laquelle l'ELISA est capable de donner une valeur quantifiée.

	Moyenne	Ecart Type
LoD (NS1/mL)	$3,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
LoQ (NS1/mL)	$1,2 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$

4.2.4.3. Cytométrie en flux

Lors de la thèse précédente, la détection par cytométrie en flux des cellules NS1 marquées par des billes Dynabeads de 1 µm dans du PBS a été réalisée. Il a été démontré que cette technique permet un comptage valide jusqu'à 3×10^3 cellules/mL (contre 10^4 à 3×10^4 NS1/mL pour le premier prototype de biopuce à un étage, dans la même matrice PBS et avec le même anticorps anti-CD138).

Lors de ces travaux de thèse, les tests en cytométrie en flux n'ont pas été refaits car les marquages des cellules par l'anticorps anti-CD138 biotinylé puis par l'anticorps secondaire fluorescent ne peuvent être réalisés qu'en PBS (et pas en milieu de culture). En d'autres termes, pour évaluer la sensibilité de détection de cellules NS1 en milieu de culture par cytométrie en flux, la première étape consisterait à centrifuger les suspensions cellulaires en milieu de culture pour les reprendre en PBS pour assurer les marquages. Ce qui revient à déterminer la sensibilité en PBS. On peut donc considérer que la sensibilité déterminée pour les tests en cytométrie en flux dans la thèse précédente est également valable pour ces travaux : 3×10^3 cellules NS1/mL.

4.3. Discussion

Les différents types de tests ont été réalisés sur le même modèle biologique, c'est-à-dire les cellules NS1, ainsi que dans le même milieu biologique, le milieu de culture, sauf pour la biopuce à un étage GMR où les différentes expériences ont été réalisées en PBS par Manon Giraud [2] [3]. Or, même en milieu de culture, il aurait été difficile d'augmenter la limite de détection de ce premier prototype sans information sur la hauteur de passage des objets et donc sur le moment magnétique permettant de mieux différencier les objets biologiques des agrégats de billes et ainsi éviter au maximum les faux positifs. Il en est de même pour les tests de cytométrie en flux, réalisés également en PBS. Un autre milieu biologique n'est pas favorable pour ce type d'expérience et ne changerait guère les résultats puisqu'il serait nécessaire de le changer en PBS par centrifugation.

Les performances des différents tests sont résumées dans le **Tableau 4.9**.

Tableau 4.9 - Comparaison des performances de la biopuce GMR à deux étages avec celles des tests bandelettes, ELISA, cytométrie en flux et biopuce GMR à un étage

TEST	Bandelettes	ELISA	Cytométrie en flux	Biopuce GMR un étage	Biopuce GMR deux étages
Limite de détection (NS1/mL)	Test non valide (absence de migration)	Entre $3,5 \times 10^3$ et $1,2 \times 10^4$	3×10^3	3×10^4	Entre 10^2 et 10^3
Durée du test	15 minutes	5-6 heures	2 heures	3 h	3 h
Volume d'échantillon	100 à 200 μ L	100 μ L en duplicat	200 μ L	200 μ L	200 μ L

Bien que les tests immunochromatographiques (tests bandelettes) sont parmi les plus utilisés, ils ne sont pas adaptés aux gros objets biologiques tels que les cellules eucaryotes qui ne migrent pas sur la membrane de nitrocellulose. Il est donc impossible de déterminer une sensibilité avec ce genre de test pour les cellules NS1. Les tests ELISA ont une sensibilité entre $3,5 \times 10^3$ et $1,2 \times 10^4$ cellules/mL en milieu de culture mais le test dure plusieurs heures du fait des différentes étapes d'incubation et de lavage, et il nécessite d'autre part du personnel qualifié. Pour la biopuce à un étage GMR, une sensibilité de 3×10^4 cellules/mL est obtenue, soit une performance de sensibilité légèrement inférieure à celle des tests ELISA mais avec un gain de temps sur la réalisation des tests et sans aucune étape de lavage. De plus, cette biopuce est facile d'utilisation cependant, comme expliqué dans la thèse de Manon Giraud [2], il est difficile de distinguer les faux positifs (agrégats de billes) des objets biologiques d'intérêt. Avec la cytométrie en flux, il est possible d'obtenir une sensibilité de 3×10^3 cellules/mL mais l'utilisation de cet instrument est complexe, seul un personnel expert peut utiliser cet instrument qui, tout comme les tests ELISA, ne peut être utilisé que dans un laboratoire conventionnel, de recherche ou expert. Quant à la biopuce GMR à deux étages, pour la première fois, grâce à cette technique, il est possible de déterminer le moment magnétique des objets circulant dans le canal microfluidique et ainsi de discriminer les agrégats de billes des objets biologiques ciblés. Un gain de sensibilité d'un facteur 100 a ainsi pu être acquis grâce à ce deuxième prototype de biopuce, atteignant une sensibilité comprise autour de 3×10^2 cellules/mL sur le même modèle de cellules myélomateuses et pour un même volume d'échantillon analysé (200 μ L). Pour un volume d'échantillon analysé plus important (1 mL), le gain de sensibilité se rapproche même d'un facteur 300 (i.e. 10^2 cellules/mL), rendant cette détection au moyen de la nouvelle biopuce particulièrement attractive, compétitive et prometteuse.

En plus de la sensibilité, la spécificité, la simplicité, du faible coût et de la portabilité, un autre avantage que possède les deux types de biopuces GMR (que partage aussi la cytométrie en flux) repose sur leur capacité à détecter les objets un à un (avantage pour les faibles concentrations en particulier) contrairement aux tests ELISA ou bandelettes qui détectent un ensemble d'objets biologiques au-delà d'une certaine concentration (les résultats des tests bandelettes sont d'ailleurs qualitatifs (i.e. détermination d'un résultat positif ou négatif) ou au mieux semi-quantitatifs).

Cependant, même si le prototype de biopuce GMR à deux étages s'avère très performant en termes de spécificité, sensibilité et simplicité, une partie des objets biologiques n'est pas détectée pour des raisons biologiques ou magnétiques (**paragraphe 4.2.1.4**). Ce phénomène est d'autant moins marqué que la concentration en objets biologiques est faible, ce qui est en faveur d'une utilisation pour la mesure de faibles concentrations, ce que cible les tests de diagnostic précoce. Toutefois, un meilleur contrôle de ces phénomènes permettrait de gagner encore en sensibilité et spécificité, rendant la biopuce que plus attractive. Pour cela, plusieurs pistes nous semblent intéressantes à étudier :

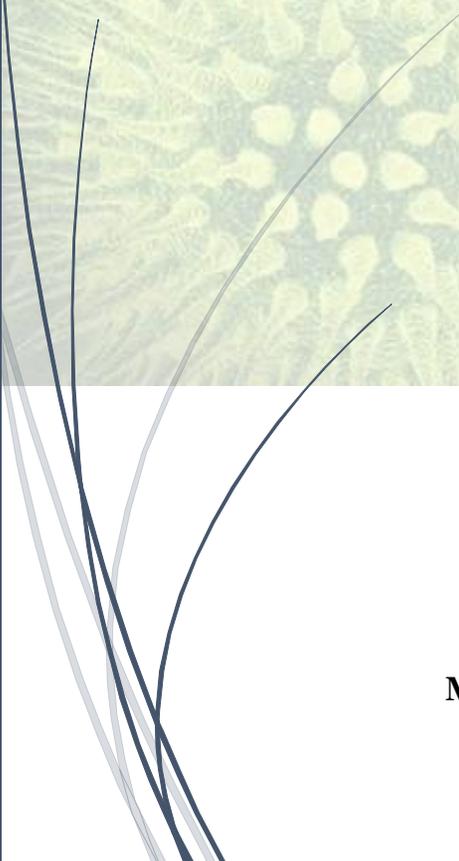
- Dissocier les clusters de cellules (par un système physique microfluidique à introduire entre l'injecteur et la biopuce, type goulot d'étranglement ou autre système).
- Persévérer dans les travaux de réduction de l'état d'agrégation des billes et améliorer l'immunocapture et donc la labélisation magnétique des objets biologiques, en collaborant avec des partenaires capables de produire sur-mesure des billes magnétiques à forte stabilité colloïdale (comme le LITEN).
- Utiliser des capteurs GMR en série pour déterminer la vitesse des objets biologiques. De cette façon, peut-être serait-il possible d'améliorer la sensibilité de détection en permettant une meilleure distinction des objets biologiques qui circulent proches dans le canal (pourvu que leur vitesse soit légèrement différente).
- Enfin, un dernier point nous semble également important à évaluer : la capacité de la biopuce à détecter des cibles biologiques diverses pour lui permettre de couvrir différents domaines d'application, autrement dit étudier sa versatilité d'utilisation. C'est dans cet objectif que quelques premiers tests préliminaires (**chapitre 5 -**) ont été réalisés au moyen d'une biopuce GMR à deux étages redimensionnée pour détecter des objets biologiques de plus petite taille (de l'ordre du micromètre): des bactéries avec un modèle non pathogène pour l'homme et facilement manipulable, *Xanthomonas arboricola*.

4.4. Références

- [1] Rosa EA, Lanza SR, Zanetti CR, Pinto AR. Immunophenotyping of Classic Murine Myeloma Cell Lines Used for Monoclonal Antibody Production. *Hybridoma* 2012;31:1–6.
<https://doi.org/10.1089/hyb.2011.0080>.
- [2] Giraud M. Mise au point d'un laboratoire sur puce pour la détection de cellules eucaryotes par des capteurs à magnéto-résistance géante n.d.:170.
- [3] Giraud M, Delapierre F-D, Wijkhuisen A, Bonville P, Thévenin M, Cannies G, et al. Evaluation of In-Flow Magneto-resistive Chip Cell—Counter as a Diagnostic Tool. *Biosensors* 2019;9:105.
<https://doi.org/10.3390/bios9030105>.



5 - Premiers essais sur un modèle de bactéries



Maikane DEROO

5.1. Table des figures & tableaux

Fig. 5.1 - Méthode d'isolement bactérien dite « des quatre quadrants »	170
Fig. 5.2 - Premier repiquage des bactéries <i>X. arboricola</i> CFBP 7634	171
Fig. 5.3 - Principe du test PCR [1].....	172
Fig. 5.4 - Résultats de la PCR sur les bactéries <i>X. arboricola</i> CFBP 7634 et <i>E.coli</i> DHA.....	174
Fig. 5.5 - Electrophorégramme de contrôle de l'anticorps Xantho5 sous sa forme réduite et non réduite	176
Fig. 5.6 - Caractérisation de l'anticorps Xantho5 par western blot indiquant que son antigène est le LPS de <i>X. arboricola</i>	177
Fig. 5.7 - Illustrations photographiques d'échantillons bactériens positifs et de contrôles négatifs avec des billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées par différents anticorps	181
Fig. 5.8 - Contrôle par immunochromatographie de la labélisation magnétique des bactéries <i>X. arboricola</i> CFBP 7634 par les billes Ademtech 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique Xantho5	182
Fig. 5.9 - Champ dipolaire théorique calculé et produit simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (traits pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Adembeads 200 nm en fonction de leur hauteur de passage z_B (7,6 μm) dans le canal.....	185
Fig. 5.10 - Histogramme du nombre de coïncidences en fonction de (A) la hauteur de passage dans le canal microfluidique z_B ou (B) du nombre de billes par objet magnétique (agrégat de billes ou bactérie marquée) pour des expériences réalisées avec des billes Adembeads 200 nm	187
Fig. 5.11 - Résultats de deux expériences réalisées pour la détection des bactéries à l'aide des billes Adembeads 200 nm.....	188

Tableau 5.1 - Résultat du dénombrement d'une culture liquide de <i>X. arboricola</i> CFBP 7634 de turbidité $DO_{600\text{nm}} = 0,682$	175
Tableau 5.2 - Exemple type d'un plan d'expérience incluant les échantillons bactériens tests de <i>X. arboricola</i> CFBP 7634 et les témoins négatifs.....	180
Tableau 5.3 - Paramètres des cinq expériences réalisées sur les bactéries avec les billes Adembeads 200 nm.....	184
Tableau 5.4 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons spécifiques et négatifs avec les billes Adembeads 200 nm.....	186

Ces travaux de recherche s'achèvent par quelques premiers tests préliminaires d'utilisation de la biopuce GMR à deux étages pour la détection d'objets biologiques encore plus petits : des bactéries. Ces premiers tests ont été réalisés sur un modèle bactérien non pathogène pour l'homme et facilement manipulable pour faciliter les mises au point. Par la suite, des tests plus poussés, qui feront l'objet d'une nouvelle thèse, seront réalisés sur différentes souches pathogènes pour l'homme : *Yersinia enterocolitica* (gastroentérites, intoxications alimentaires) et *Legionella pneumophila* (pneumonies par inhalation de microgouttes).

5.2. Bactéries et anticorps utilisés

Cette étude préliminaire a été réalisée sur l'espèce bactérienne *Xanthomonas arboricola*. Ce sont des protéobactéries à gram négative (définition en [paragraphe 5.2.3.3](#)) appartenant à la famille des Xanthomonadaceae. Cette espèce bactérienne comprend plusieurs pathovars responsables de diverses maladies chez les végétaux, en particulier chez les arbres, comme la maladie des tâches bactériennes des arbres à noyau (pêcher, abricotier, cerisier, etc.).

Pour la mise au point des premières expériences avec les bactéries, une souche non phytopathogène de la bactérie *X. arboricola* a été choisie et cultivée au LERI. Il s'agit d'une souche isolée en France en 2002 sur des noyers : la souche *X. arboricola* CFBP 7634 qui est incapable de provoquer de maladie sur les espèces végétales ni de susciter de réaction d'hyper-sensibilité.

La bactérie a été commandée au Centre International de Ressources Microbiennes (CIRM) dans la collection CFBP (Collection Française de Bactéries associées aux Plantes). La souche a été reçue sous forme d'une ampoule de bactéries lyophilisées.

Pour utiliser ce modèle biologique dans notre projet, il est indispensable de disposer d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement cette bactérie pour parvenir à marquer magnétiquement ces souches au moyen de billes magnétiques fonctionnalisées par les anticorps en question. L'anticorps que nous avons utilisé, dirigé contre la bactérie *X. arboricola* CFBP 7634, est l'anticorps monoclonal de souris Xantho5 qui a été produit au LERI.

5.2.1. Culture

5.2.1.1. Préparation des milieux de culture

Pour utiliser expérimentalement les bactéries *X. arboricola*, un milieu nutritif spécifique est nécessaire pour les cultiver et ainsi les maintenir métaboliquement actives (i.e. vivantes). Ce milieu couvre tous les besoins des bactéries en présentant également un pH optimal pour leur croissance, ici pH 7,2 ([annexe I - 7.9](#)). Ce milieu nutritif peut se présenter sous deux formes : soit gélosée (i.e. support nutritif gélifié solide sur lequel poussera la bactérie), soit liquide (dans lequel poussera la bactérie). L'avantage d'une gélose repose sur la possibilité d'étaler les bactéries de façon à les disperser pour les isoler, ce qui permet un examen visuel des colonies bactériennes (i.e. amas de bactéries identiques, visible à l'œil nu, formées par multiplication à partir d'une seule bactérie initiale). Une culture liquide permet, quant à elle, d'obtenir une suspension bactérienne.

Le milieu gélosé LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) comprend, comme son nom le suggère, 7 g d'extrait de levure, 7 g de bacto peptone, 7 g de glucose et 15 g d'agar par litre de milieu, à un pH ajusté de 7,2. Il est stérilisé par autoclavage (20 minutes à 120 °C) juste avant ajout du glucose (stérilisé par filtration sur 0,22 µm) et coulage des géloses sur boîtes de Pétri en conditions stériles (sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM, hotte à flux laminaire)).

Le milieu liquide (LPG, Levure Peptone, Glucose) est, quant à lui, de composition identique, mais sans agar.

5.2.1.2. Première remise en culture des bactéries

La toute première remise en culture des bactéries *X. arboricola* est réalisée selon les recommandations du CIRM ([annexe J - 7.10](#)). Dans un premier temps, l'ampoule est désinfectée à l'alcool puis cassée. Le lyophilisat à l'intérieur de l'ampoule est ensuite remis en suspension dans 300 µL de milieu de culture liquide. La solution est homogénéisée puis deux gouttes de cette solution sont déposées sur une gélose. Une goutte est laissée intacte et la seconde est étalée en trois ou quatre secteurs afin d'obtenir des colonies isolées (voir méthode sur [Fig. 5.1](#)). La gélose et la solution liquide de bactéries sont ensuite mis à l'étuve à la température optimale de croissance de la souche : 25°C.

Les bactéries sont laissées à l'étuve pour une durée d'un à trois jours selon leur croissance.

5.2.1.3. Repiquage des bactéries

Pour maintenir les bactéries métaboliquement actives, il est nécessaire de les repiquer régulièrement (tous les 15 jours), c'est-à-dire de réensemencer une nouvelle gélose nutritive à partir d'une colonie présente sur une gélose précédente. L'ensemencement peut se réaliser de différentes manières mais afin d'obtenir des colonies isolées la méthode des quatre quadrants est souvent utilisée ([Fig. 5.1](#)).

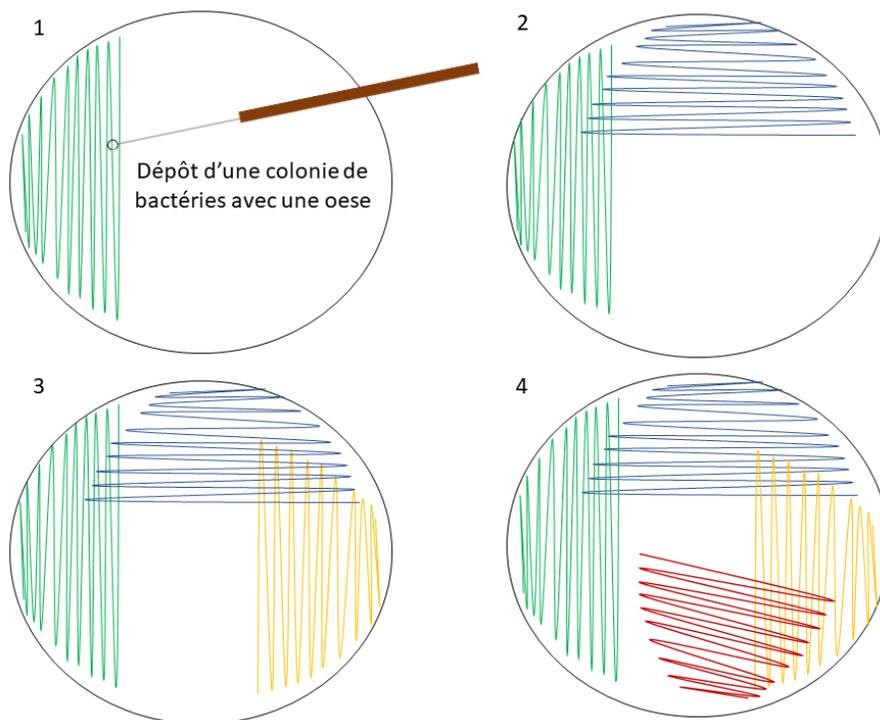


Fig. 5.1 - Méthode d'isolement bactérien dite « des quatre quadrants »

A l'aide d'une oese stérile, une colonie isolée est prélevée sur une gélose précédemment ensemencée. La colonie prélevée est déposée à l'oese sur la nouvelle gélose en traçant des stries de l'étape 1 à l'étape 4. De cette façon, les bactéries sont de plus en plus dispersées et des colonies isolées apparaîtront nécessairement dans un des quadrants, après culture.

Ensuite, la boîte de Pétri gélosée est mise à l'étuve à 25°C puis au bout de 72 h, des colonies isolées sont observées (Fig. 5.2).

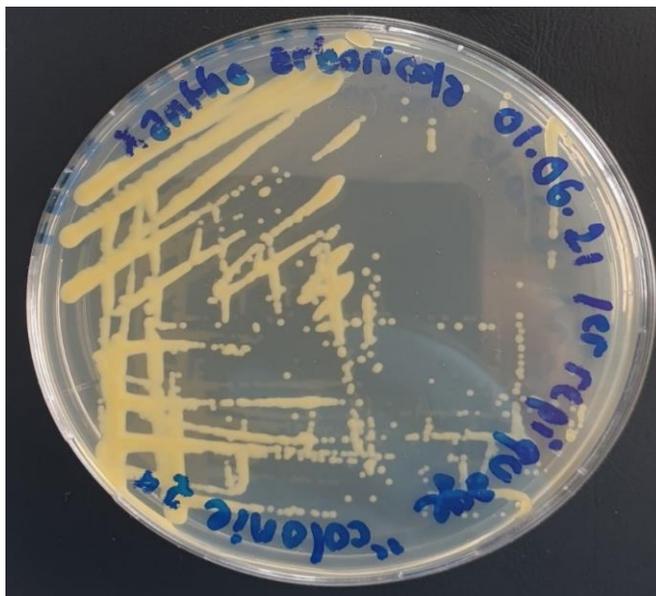


Fig. 5.2 - Premier repiquage des bactéries *X. arboricola* CFBP 7634

Les colonies isolées sont les petits points de couleur jaune.

5.2.1.4. Congélation des souches bactériologiques

Les souches bactériennes peuvent être congelées sous forme de glaçons de glycérol ou sous forme de cryobilles.

5.2.1.4.1. Sous forme de glaçons de glycérol

Dans des cryotubes à vis, 140 μ L de glycérol 80 % en eau stérile et 660 μ L de culture bactérienne liquide fraîche sont mélangés. Les cryotubes sont ensuite congelés à -80°C.

Pour remettre en culture une bactérie conservée sous forme d'un glaçon de glycérol, il suffit de gratter la surface du glaçon à l'aide d'une oese stérile et d'ensemencer une gélose nutritive fraîche avec cette oese (par exemple, selon la méthode des quadrants, Fig. 5.1).

5.2.1.4.2. Sous forme de cryobilles

Dans des cryotubes à billes est agitée une oese sur laquelle une colonie de bactéries *X. arboricola* a été collectée sur gélose. Le milieu de conservation excédentaire des cryobilles est retiré puis les cryobilles sont ensuite congelées à -80°C.

Pour remettre en culture une bactérie conservée sous forme de cryobilles, il suffit de prélever stérilement une bille, de la déposer sur une gélose nutritive fraîche et d'agiter cette gélose pour permettre à la bille de rouler à la surface de la gélose et d'y étaler les bactéries qu'elle contient.

5.2.2. Bactéries

5.2.2.1. Identification des bactéries d'intérêt

Avant toute expérience cruciale ou en cas de suspicion de contamination, il peut être nécessaire de vérifier l'identité de la bactérie comme étant l'espèce *X. arboricola* (et éventuellement la souche CFBP 7634) et non un contaminant. Cette étape a notamment été indispensable avant de préparer l'immunogène requis pour la production des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre cette bactérie. Ce contrôle a été réalisé par test PCR [1] (Polymérase Chain Reaction) grâce à un protocole décrit dans la littérature par Cesbron et al. [2].

Un test PCR consiste en une amplification enzymatique *in vitro* par une enzyme (nommée ADN polymérase) d'un court fragment (exemple : un gène précis) du génome de l'agent recherché (Fig. 5.3). Or, Cesbron et al. [2] ont réalisé une étude comparative des génomes de différentes souches pathogènes et non pathogènes de *X. arboricola*, et ont montré, entre autres, que la souche *X. arboricola* CFBP 7634 possédait 2 gènes flagellaires, *flgB* et *flgQ*, amplifiables par PCR dans des conditions mises au point et décrites en détail dans l'article (séquence des amorces à utiliser, conditions des cycles d'amplification, taille des produits de PCR attendus etc.). Ce ne sont pas des gènes spécifiques à la souche *X. arboricola* CFBP 7634, mais des gènes spécifiques de l'espèce *X. arboricola*, ce qui nous suffit amplement comme contrôle.

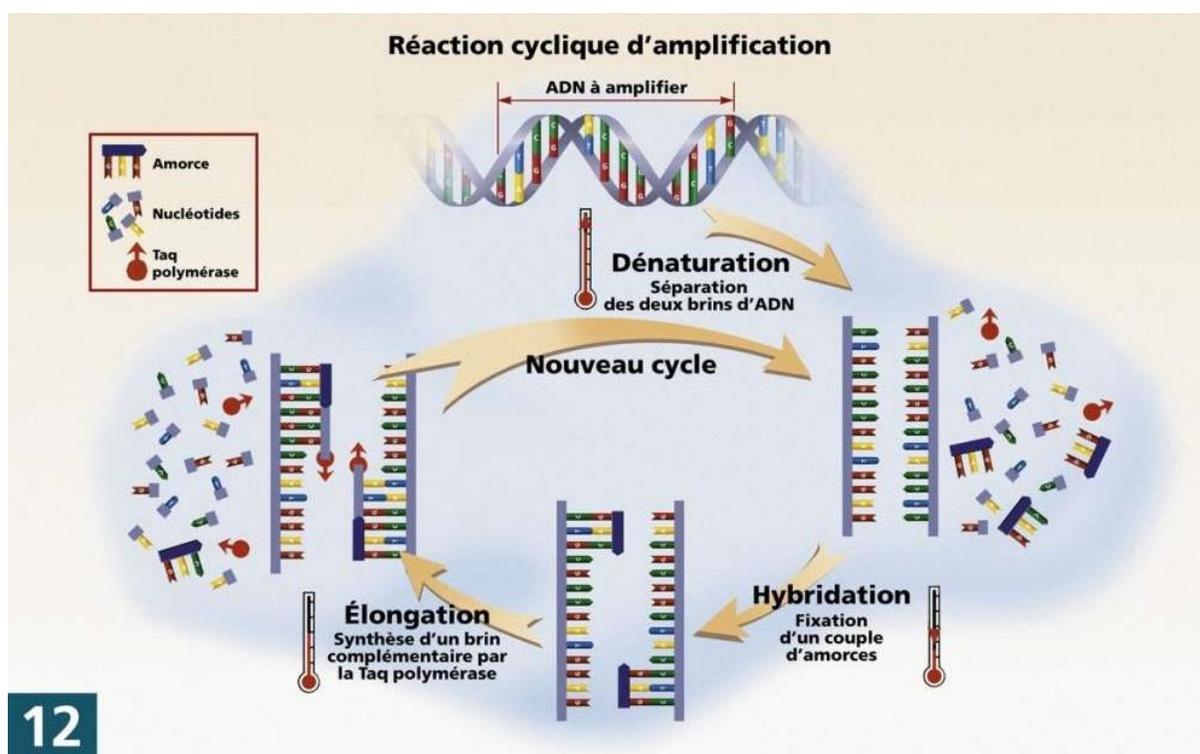


Fig. 5.3 - Principe du test PCR [1]

En pratique, un test PCR est réalisé dans des microtubes, dans un appareil nommé « thermocycleur » qui réalise une suite de cycles avec des paliers de température qui va permettre de sélectionner et d'amplifier une séquence d'ADN donnée (comme un gène) présente au départ dans la bactérie en faible quantité. Pour cela, une enzyme est utilisée : l'ADN polymérase qui se déplace le long de l'ADN, « lit » la séquence des nucléotides et la recopie grâce à l'ajout de nucléotides libres dans le milieu réactionnel : on dit qu'elle permet la répliation (i.e. copie) de l'ADN. Pour fonctionner, cette ADN polymérase a besoin d'un certain

nombre d'éléments. Elle n'est pas capable d'amorcer à elle seule la synthèse d'un nouveau brin d'ADN : elle ne peut qu'ajouter des nucléotides à un petit brin d'ADN existant, autrement dit, elle a besoin d'une amorce sur laquelle ajouter de nouveaux nucléotides. Dans notre cas, les séquences des amorces pour amplifier spécifiquement les deux gènes *fleQ* et *flgB* (respectivement, FleQ forward / FleQ reverse et FlgB forward / FlgB reverse) ont été publiées [2]. C'est une chance car la conception d'amorces spécifiques et efficaces est un exercice difficile (exigences sur le nombre de nucléotides, sur leur composition (taux de GC, température d'amorçage T_m), sur la spécificité (ne doit pas permettre l'amplification d'une autre séquence ADN que celle recherchée) etc.). Pour fonctionner, l'ADN polymérase a également besoin, outre des nucléotides libres (DNTP, désoxyribonucléotide triphosphate : dATP, dCTP, dGTP, et dTTP), d'un tampon de réaction optimal et de chlorure de magnésium ($MgCl_2$). Nous avons donc utilisé une ADN polymérase commerciale fournie avec un « master mix », autrement dit une solution prête à l'emploi contenant l'ensemble des composants nécessaires à la PCR.

Ensuite, le mélange réactionnel, contenant l'ADN du génome de la bactérie à tester (1 μ L de culture bactérienne liquide chauffée 10 minutes à 100°C pour lyser les bactéries), l'ADN polymérase, le couple d'amorces spécifiques à chaque gène et le master mix, est mis dans un thermocycleur. Sont testés à la fois la bactérie *X. arboricola* CFBP 7634 (pour contrôle) mais aussi, en témoin négatif, une autre souche bactérienne, *Escherichia coli* DHA, et de l'eau stérile.

Dans le thermocycleur, une suite de cycles thermiques va s'enchaîner comme décrit en **Fig. 5.3**:

- Dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 s : les deux brins de la double hélice vont se séparer.
- Hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée pendant 30 s à la température d'amorçage spécifique aux amorces (ici 58°C) : les couples d'amorces Forward et Reverse du gène *fleQ* (et resp. *flgB*) vont venir se fixer chacune sur l'un des deux brins d'ADN où débute (Forward) et se finit (Reverse) la séquence à amplifier.
- Elongation grâce à l'action de l'ADN polymérase. Cette étape est réalisée à sa température optimale de fonctionnement et pendant la durée nécessaire (durée en fonction de la taille du produit à amplifier), ici 68°C pendant une minute. Pendant cette durée, l'ADN polymérase copie le brin complémentaire d'ADN à l'aide des amorces et des nucléotides libres.

Ces trois cycles sont répétés plusieurs fois (ici 35 fois) afin d'amplifier suffisamment la séquence d'ADN pour pouvoir l'observer qualitativement par électrophorèse.

Ainsi, à la fin de la PCR, le produit amplifié (ou amplicon) est analysé par migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,5% (maillage adapté à la taille de l'amplicon) (**Fig. 5.4**). Pour déterminer la taille de l'amplicon, un standard (contenant des molécules d'ADN de poids moléculaires connus) est indispensable pour servir d'échelle. Le standard utilisé ici se nomme « 50 bp » (comme son nom l'indique, il contient des ADN de 50 en 50 paires de bases jusqu'à 500 bp).

La taille observée pour les amplicons issus des colonies bactériennes de *X. arboricola* CFBP 7634 (**Fig. 5.4B**) correspondent bien à la taille attendue des gènes *fleQ* (215 bp) et *flgB* (302 bp) indiquée sur la **Fig. 5.4A** [2]. Ce qui confirme donc l'identité de l'espèce *X. arboricola*. On peut noter que les amorces pour *flgB* ont permis d'amplifier une séquence d'ADN d'environ 2000 bp pour *E. coli* (et aucune amplification pour *fleQ*), démontrant l'absence de gènes strictement identiques chez *E. coli* (et la difficulté de produire des amorces spécifiques, puisqu'ici les amorces FlgB forward et FlgB reverse ont été capables de se fixer sur l'ADN de *E. coli*).

(A)

Gene	Primer name	Forward primer	Reverse primer	PCR fragment size (bp)	Tm (°C)
<i>copB</i>	b07340	CCGACGAAACACAGGTTCTTT	CTCCAGCTCGAACCAGTAGG	314	52
<i>copK</i>	b07280	AAATCGCAAATTGT CATTGC	GCTTTCCTGTGCCATCTTTC	153	50
<i>copD</i>	b07290	AATGTTGAAATTGAACGCTACCTTG	GGTTCAGTGGGAGACAAGA	589	50
transcription regulator	b7430	GAGATCTACGGGCAATGGATGATC	TCATTGTGCATCGCCTCCC	303	55
<i>traG</i> like	b7530	CTACCTGGAGTACTACCTAACCCCTC	CTGTCGTA CTGGATGGTGTTCAG	270	58
unknown	b7630	GATCCCTATCCGTTCAAAGTCTCGG	CTGTTGGTGTCTTCTGCTGGTTG	222	56
unknown	b7730	CCATTGTCGAACTGCTCACTCA	AAGACTTCTTCGTTGGCATCATCA	205	55
unknown	b7830	CTGATGTGGCTCTGGTTGATCTTC	GAATCTGGCGGGTGTCTTTGAG	205	58
unknown	b7930	GGGGAATT CATCATCAGTACATCT	TCGAATCCAGTTT CACGGACTC	397	56
Mercuric transport	b8020	ATGTGGAAACCCAAGAACGG	CAGTAGAACACGGCGCAGGAC	350	56
ATP ase	b8150	GAAGAACCCTCAACCTGAACATGAAC	GCGGT CACC TTGTATT CGAAAG	397	55
<i>fleQ</i>	<i>fleQ</i> Xarb	GTCCC GCATTCTGTTGATCGACA	AGCTTGGCATCGGCCAGCCAGT	215	58
<i>flgB</i>	<i>flgB</i> Xarb	CGCATGAAGCTCATTGCCAGCAA	CTTGGATTGAGGGAAGCTCAGC	302	58

(B)

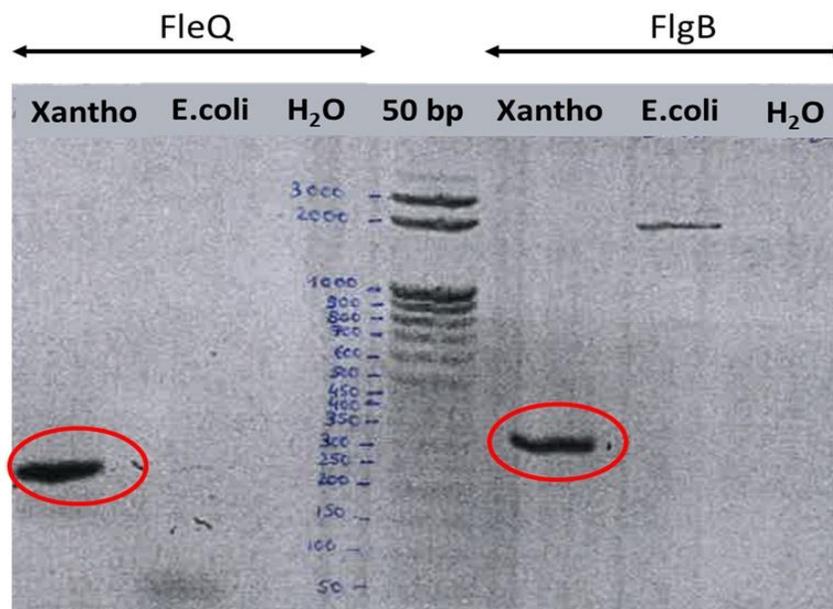


Fig. 5.4 - Résultats de la PCR sur les bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 et *E.coli* DHA

A: Tableau issu de Cesbron *et al.*, *Frontiers in Plant Science*, 2015 [2] avec les caractéristiques des amorces conçues pour amplifier les gènes *fleQ* et *flgB*. B: Résultats du test PCR avec les bandes des amplicons à 215 et 302 bp pour la bactérie *X. arboricola* correspondant aux tailles attendues. bp = paire de bases.

5.2.2.2. Correspondance entre la turbidité à 600 nm et la concentration en bactéries

La densité optique (DO, synonyme de l'absorbance) mesurée à 600 nm augmente avec la concentration en bactérie dans un milieu (ou turbidité). Ainsi, pour avoir rapidement une idée de la concentration en bactérie dans une solution liquide, la mesure de cette absorbance à 600 nm est très utile, pourvu que l'on ait préalablement établi la correspondance entre les deux (qui peut varier sensiblement d'une espèce bactérienne à une autre). Le dénombrement par étalement de dilutions en série de la solution bactérienne reste toutefois la méthode de référence (fiable et plus précise) pour quantifier la concentration en bactéries viables et cultivables (en UFC/mL, Unité Formant Colonie) mais cela reste une technique longue (12 h minimum). A l'inverse, la mesure de l'absorbance à 600 nm ne permettra pas de distinguer les bactéries vivantes des mortes : la correspondance entre DO_{600nm} et dénombrement bactérien (en CFU/mL) n'est donc valable qu'en phase de croissance exponentielle des bactéries, avant l'autolyse des bactéries dans le milieu de culture.

Pour établir la correspondance entre DO_{600nm} et dénombrement bactérien, une culture liquide de *X. arboricola* CFBP 7634 en phase exponentielle de croissance a été doublement analysée : par mesure de sa turbidité à 600 nm ($DO_{600nm} = 0,682$) et par dénombrement sur géloses LPGA (Tableau 5.1).

En moyenne, 7,97 bactéries sont présentes dans les 100 µL de la dilution au 1/10⁷ de la culture liquide de *X. arboricola* CFBP 7634. Soit 7,97 × 10⁸ CFU/mL dans la culture liquide de DO_{600nm} égale à 0,682. Ainsi, en phase exponentielle de croissance, la correspondance entre DO_{600nm} et concentration en *X. arboricola* viables et cultivables est approximativement : 1 DO_{600 nm} = 10⁹ CFU/mL.

Tableau 5.1 - Résultat du dénombrement d'une culture liquide de *X. arboricola* CFBP 7634 de turbidité DO_{600nm} = 0,682
CFU = Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie).

100 µL étalés sur gélose à la dilution de :	Nombre de bactéries comptées sur la gélose (CFU)	
	Gélose 1	Gélose 2
10 ⁻³	+++	+++
10 ⁻⁴	++	++
10 ⁻⁵	1008	856
10 ⁻⁶	119	53
10 ⁻⁷	10	2
Pur inactivé 10 minutes à 80°C	0 même au bout de 5 jours	

5.2.3. Anticorps

5.2.3.1. Production des anticorps dirigés contre *X. arboricola* CFBP 7634

Comme expliqué dans le [paragraphe 1.2.1.2](#), pour produire des anticorps monoclonaux dirigés contre *X. arboricola* CFBP 7634, la première étape consiste à produire l'immunogène.

X. arboricola CFBP 7634 étant une souche ni phytopathogène, ni pathogène pour l'homme, nous avons supposé qu'elle ne serait pas mortelle pour les souris. Nous avons donc décidé d'immuniser les souris avec une préparation de bactéries vivantes (préparées extemporanément), à raison d'environ 5 × 10⁸ CFU administrés par voie intrapéritonéale (dans un volume de 100 µL de PBS stérile). Les souris ont été immunisées quatre fois à trois semaines d'intervalle, puis mises au repos deux mois avant un boost (i.e. injection de l'immunogène trois jours de suite pour induire une réponse immunitaire de type mémoire (IgG)) et sacrifice des souris (le lendemain du dernier boost) pour réaliser la fusion lymphocytaire avec les myélomes murins ([paragraphe 1.2.1.2](#) et [Fig. 1.2](#)).

C'est de cette façon qu'a été sélectionné et produit l'anticorps monoclonal murin Xantho5, d'isotype IgG2a, dirigé contre la souche *X. arboricola* CFBP 7634.

5.2.3.2. Purification de l'anticorps Xantho5

L'anticorps Xantho5 produit a été purifié (à partir du surnageant de culture de l'hybridome sécréteur de cet anticorps) par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A ([paragraphe 3.4.2.2.2](#)). Une électrophorèse de contrôle a ensuite été réalisée pour évaluer sa pureté et celle-ci s'élève à 95,7 % (voir profil électrophorétique de la [Fig. 5.5](#)).

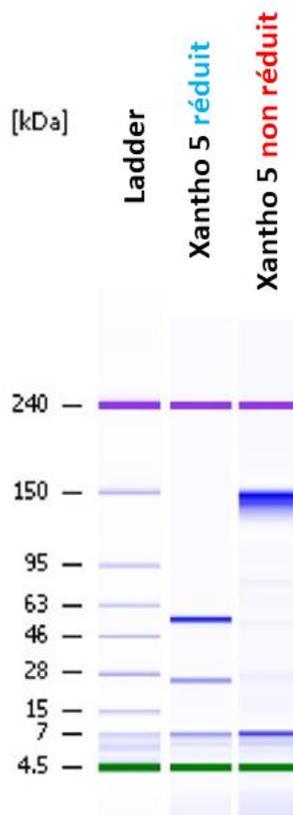


Fig. 5.5 - Electrophorégramme de contrôle de l'anticorps Xantho5 sous sa forme réduite et non réduite

Sous sa forme non réduite, l'anticorps Xantho5 présente bien un poids moléculaire autour de 150 kDa caractéristique d'une IgG. Sous sa forme réduite (en présence de β -mercaptoéthanol réduisant les ponts disulfures), on peut distinguer la chaîne lourde autour de 50 kDa et la chaîne légère autour de 25 kDa.

5.2.3.3. Caractérisation de l'anticorps

Afin de mieux connaître l'anticorps Xantho5, il est possible de le caractériser davantage.

Dans un premier temps, il est important de savoir qu'il existe une classification des bactéries par coloration de Gram [3] [4]. Cette coloration de Gram permet, lors d'une infection bactérienne par exemple, de connaître le type de bactérie responsable de l'infection afin de choisir au mieux un traitement. Cette technique consiste à colorer les bactéries au Violet de gentiane, de les décolorer à l'alcool et de les recolorer à la fuchsine de Ziel puis de les observer au microscope. Selon leur composition et l'épaisseur de leur paroi, deux couleurs, caractérisant deux types de bactéries, vont apparaître. Le violet pour les bactéries dites Gram (+) et le rouge pour les bactéries dites Gram (-).

Les bactéries Gram (+) ont une paroi épaisse et uniforme, l'alcool ne peut la pénétrer rendant la recoloration impossible ainsi les bactéries restent violettes. Quant aux bactéries Gram (-), leur paroi est beaucoup plus fine ce qui permet à l'alcool d'y pénétrer pour la décoloration et donc la fuchsine de Ziel peut ainsi se fixer et colorer les bactéries en rouge. La paroi des bactéries Gram (+) est, en effet, composée d'une épaisse couche constituée en grande partie de peptidoglycane alors que la paroi des bactéries Gram (-) se compose d'une fine couche de peptidoglycane mais plus en profondeur, avec en surface une membrane externe composée de phospholipides organisés en bicouche et contenant diverses protéines (intrinsèques, porines, etc.) et du lipopolysaccharide (LPS) (Fig. 5.6A) [5] [6] . La bactérie *X. arboricola* étant à gram négative, les anticorps dirigés contre cette bactérie peuvent reconnaître soit le LPS, soit une protéine en surface de la membrane externe de ces bactéries Gram (-).

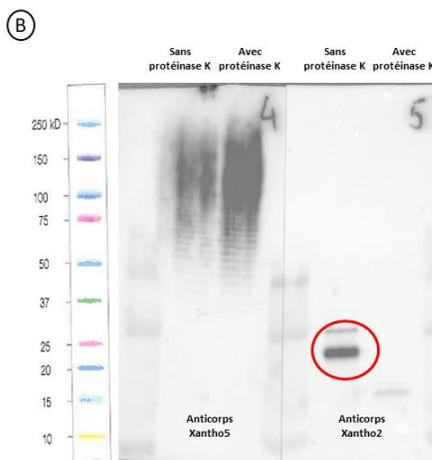
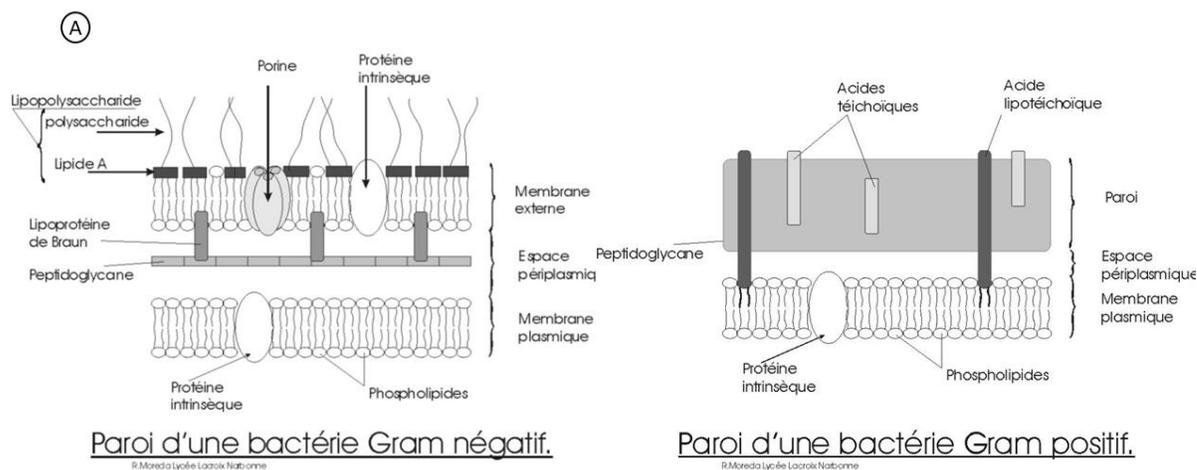


Fig. 5.6 - Caractérisation de l'anticorps Xantho5 par western blot indiquant que son antigène est le LPS de *X. arboricola*
A: Structure des bactéries à Gram positif (à droite) et à Gram négatif (à gauche) [5] [6] et B: Résultat du western blot : réactivité des anticorps Xantho2 et Xantho5.

Ainsi pour caractériser l'anticorps Xantho5 et déterminer la nature (LPS ou protéique) de son antigène, un western blot¹⁵ [7] a été réalisé.

Ce western blot consiste, dans un premier temps, à séparer par électrophorèse (principe [paragraphe 3.4.2.2.2](#)) les différentes molécules de la bactérie préalablement lysée (par chauffage à 95°C). Les

¹⁵ Le western blot a été réalisé par Dominique Marcé

différentes molécules (protéines diverses, LPS, lipides, sucres, ADN etc.) sont ainsi séparées dans un gel de polyacrylamide en fonction de leur taille (poids moléculaire). Lors de cette étape, les molécules, dénaturées et chargées négativement par un détergent, vont migrer dans le gel du pôle négatif vers le pôle positif. Les petites molécules vont migrer plus rapidement dans le maillage du gel. A la fin de la migration, des bandes invisibles (à moins de les colorer au bleu de Coomassie) correspondantes aux molécules de différentes tailles seront présentes dans le gel. Pour identifier laquelle de ces bandes contient l'antigène reconnu par l'anticorps Xantho5, les molécules séparées sur le gel sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidène Fluoride) sous effet d'un champ électrique. Ainsi exposées sur la surface mince de la membrane, l'anticorps primaire Xantho5, une fois ajouté à la surface de celle-ci, pourra spécifiquement se fixer sur son antigène. Puis un anticorps secondaire spécifique de l'espèce qui a produit l'anticorps primaire va reconnaître l'anticorps primaire. Pour finir, cet anticorps secondaire, couplé à un fluorophore pour une détection par fluorescence ou à une enzyme (comme la peroxydase de Raifort ou phosphatase alcaline) pour une révélation en chimioluminescence, permettra l'identification de la bande contenant l'immunogène reconnu par l'anticorps Xantho5.

Afin de savoir si l'anticorps Xantho5 reconnaît le LPS ou une protéine en surface de la paroi bactérienne, une enzyme, la protéinase K [8], a été utilisée pour traiter (ou pas) le lysat bactérien de *X. arboricola* en amont de la réalisation du western blot. Cette enzyme dégrade toutes les protéines en clivant les liaisons peptidiques au niveau des carboxyles des acides aminés. Ainsi, deux cas de figure peuvent se présenter :

- Si l'anticorps Xantho5 reconnaît une protéine, en absence de traitement à la protéinase K, les protéines présentes dans la bactérie ne seront pas dégradées et une bande protéique (correspondant au poids moléculaire de l'antigène) sera révélée par l'anticorps Xantho5. A contrario, avec un traitement du lysat à la protéinase K, les protéines seront dégradées en peptides et plusieurs petites bandes d'intensité faible seront révélées par Xantho5 à des poids moléculaires inférieurs à celui de la protéine intacte (i.e. sans protéinase K).
- Mais si l'anticorps reconnaît le LPS (qui, comme son nom l'indique n'est pas de nature protéique, mais lipidique et sucre), que ce soit avec ou sans protéinase K, le profil en western blot de la cible reconnue par l'anticorps Xantho5 sera le même : un profil caractéristique en « échelle » en raison d'une diversité des longueurs des différentes chaînes de LPS existant en surface de la bactérie.

D'après les résultats présentés sur la **Fig. 5.6B** et les explications précédentes, on peut conclure que l'anticorps Xantho5 reconnaît le LPS de la bactérie Gram (-) *X. arboricola* CFBP 7634 alors qu'un autre anticorps (Xantho2) reconnaît, quant à lui, une protéine à sa surface.

5.3. Protocole expérimental

5.3.1. Conception d'une biopuce pour les bactéries

Les expériences pour la détection de bactéries ont toutes été menées avec la même biopuce. Elle a été adaptée à l'étude de ce nouveau modèle biologique dont la taille est inférieure à celle des cellules, en réduisant d'un facteur 3 la hauteur du canal. En effet les bactéries sont labélisées par des billes magnétiques Adembeads 200 nm ayant un moment magnétique faible et donc difficilement détectables avec une hauteur de canal comprise entre 20 et 25 μm .

C'est pourquoi, la hauteur du canal a été réduite à 7,6 μm en remplaçant la SU-8 2025 par de la SU-8 2007 (**annexe A - 7.1**) lors de la conception du canal microfluidique. Typiquement, pour une hauteur de

canal entre 5 et 10 μm (nécessaire pour l'étude des cellules procaryotes), les paramètres sont les suivants : 5 s-500 RPM-300 RPM/s, 30 s-4000 RPM-300 RPM/s, 5 s-6000 RPM-1000 RPM/s. Le reste du protocole reste identique à la conception d'une biopuce pour la détection des cellules.

Les épaisseurs de SU-8 2002 et de NOA restent inchangées cependant il serait intéressant de réduire l'épaisseur de colle NOA afin d'éviter une perte de sensibilité trop importante.

5.3.2. Préparation des échantillons

Une colonie de bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 est prélevée sur une culture gélosée à l'aide d'une oese puis mélangée à 1 mL de milieu de culture liquide LPG. La turbidité de la solution bactérienne est mesurée donnant une indication approximative de la concentration en bactéries (puisque en phase de croissance exponentielle, $\text{DO}_{600\text{ nm}} = 10^9$ CFU/mL, [paragraphe 5.2.2.2](#)). Pour les mises au point des expériences avec les bactéries, les dénombrements ne sont pas réalisés systématiquement pour l'instant. Ainsi la concentration en bactérie est approximative, mais cela suffit pour démontrer la faisabilité de la détection des bactéries par la biopuce GMR.

Ensuite des dilutions en cascade d'un facteur 10, à partir d'une forte concentration (souvent autour de 10^7 CFU/mL), sont réalisées en milieu de culture liquide LPG : 1 mL de chacune de ces dilutions sera utilisé pour chaque test expérimental et constituera les échantillons bactériologiques positifs.

Les contrôles négatifs utilisés pour évaluer la spécificité de détection de la biopuce sont :

- D'une part, un mélange de bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 incubées avec des billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées par un anticorps non pertinent (mais de même isotype IgG2a que l'anticorps Xantho5). Il s'agit de l'anticorps monoclonal de souris IpaD315, dirigé contre les bactéries Shigella ([paragraphe 3.4.2.2.1](#)).
- D'autre part, un deuxième contrôle négatif est également utilisé, il s'agit uniquement de billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique Xantho5, en milieu LPG et en absence des bactéries cibles *X. arboricola* CFBP 7634.
- Dans le futur, un autre modèle bactérien facile à cultiver ne présentant pas à sa surface le marqueur biologique ciblé par les anticorps anti-*X. arboricola* pourra être utilisé. Ce troisième contrôle négatif, par l'absence de cible biologique dans l'échantillon mais par la présence de contaminants, pourrait parfaitement mimer la réalité d'un échantillon biologique inconnu dans un contexte de diagnostic.

Afin de détecter les bactéries, qui ne sont naturellement pas magnétiques, à l'aide de nos capteurs GMR, les billes Adembeads carboxyles 200 nm fonctionnalisées par l'anticorps Xantho5 ont été utilisées. Ces billes s'agrègent ([Fig. 5.7d](#)) mais leur état d'agrégation, bien qu'améliorable, ne semble pas critique pour démontrer la faisabilité de la détection des bactéries (l'état d'agrégation de ces Adembeads 200 nm fonctionnalisées par Xantho5 est bien plus satisfaisant que celui observé avec une fonctionnalisation par l'anticorps de rat anti-CD138, [Fig. 3.4, paragraphe 3.3.1.3](#)).

Les billes fabriquées par le LITEN ne sont pas encore au point pour l'immuno-capture d'objets aussi petits que les bactéries. Or, il est assez difficile d'observer au microscope, avec un grossissement 40X, les bactéries dont le diamètre est seulement d'environ 1 μm . Pour observer les bactéries couplées aux billes Adembeads, qui ont un diamètre de 200 nm, un microscope Olympus avec un objectif 100X à immersion a été utilisé. Et même dans ces conditions, il n'est pas simple d'observer la bonne labélisation des objets biologiques. Il est nécessaire que l'immuno-capture des bactéries soit optimisée et que l'état d'agrégation

des billes magnétiques soit maîtrisé et réduit, ce qui n'est pas encore le cas avec les billes du LITEN. Pour cette raison, les billes commerciales Adembeads 200 nm ont été préférées à celles du LITEN pour les différentes mises au point de la détection des bactéries par les capteurs GMR.

Les billes Adembeads carboxyles 200 nm sont couplées aux anticorps Xantho5 de la même façon que les autres anticorps utilisés pour la détection des cellules NS1 ([paragraphe 3.2.2.5](#)).

Les bactéries *X. arboricola* forment des bâtonnets dont la taille varie de 1,1 à 3,8 µm (longueur) × 0,3 à 0,7 µm (largeur) [9]. Cette géométrie en forme de bâtonnet (et non de forme sphérique comme les cellules NS1) complexifie le calcul du nombre de billes pouvant marquer les bactéries. Afin d'avoir une estimation, le calcul d'occupation stérique a été réalisé comme s'il s'agissait de sphères ayant un diamètre variant entre 1 et 4 µm. Pour des billes de 200 nm de diamètre, nous trouvons une occupation stérique comprise entre 100 et 1600 billes. Considérons alors qu'un bâtonnet a un diamètre moyen de 2,5 µm, alors l'occupation stérique moyenne sera d'environ 630 billes Adembeads 200 nm.

Les gammes de concentration en bactéries utilisées lors des expériences sont plus élevées que pour les expériences avec les cellules NS1. En effet, ces objets biologiques sont en moyenne 2,5 fois plus petits que les cellules NS1 (diamètre moyen de 6 µm), rendant la détection plus complexe. C'est pourquoi, il est nécessaire de commencer les expériences avec une concentration élevée en bactéries, soit 10⁷ CFU/mL puis de diminuer progressivement les concentrations lorsque la détection GMR le permet. Comme nous l'avons montré précédemment, pour avoir une bonne labélisation magnétique des objets biologiques, il faut que les billes soient surnuméraires. Des mises au point ultérieures devront être réalisées afin de déterminer la quantité exacte de billes nécessaires à la bonne labélisation des bactéries mais, en attendant, 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées sont ajoutées à chaque suspension bactérienne préparée de 1 mL (ce qui représente un excès de billes/bactérie d'un facteur minimal de 100).

Les expériences sur les bactéries ont commencé lors de ma troisième année de thèse. Quelques expériences seulement ont été réalisées. Un exemple de plan-type d'expérience est présenté dans le [Tableau 5.2](#). Un ou deux contrôle(s) négatif(s) est/sont systématiquement inclus aux expériences

Tableau 5.2 - Exemple type d'un plan d'expérience incluant les échantillons bactériens tests de *X. arboricola* CFBP 7634 et les témoins négatifs

<i>Echantillons (1 mL) en milieu LPG</i>	<i>Types d'échantillon</i>
<i>10³ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	Echantillons tests
<i>10⁴ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	
<i>10⁵ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	
<i>10⁶ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	
<i>10⁷ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	
<i>10⁷ CFU/mL + 10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées IpaD315</i>	Contrôles négatifs
<i>10⁹ billes magnétiques fonctionnalisées Xantho5</i>	

5.3.3. Immunocapture des bactéries *X. arboricola* CFBP 7634

Tous les échantillons sont ensuite incubés sous agitation 2 heures à 20°C afin que les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique Xantho5 puissent immunocapturer correctement leur cible : les bactéries *X. arboricola* CFBP 7634.

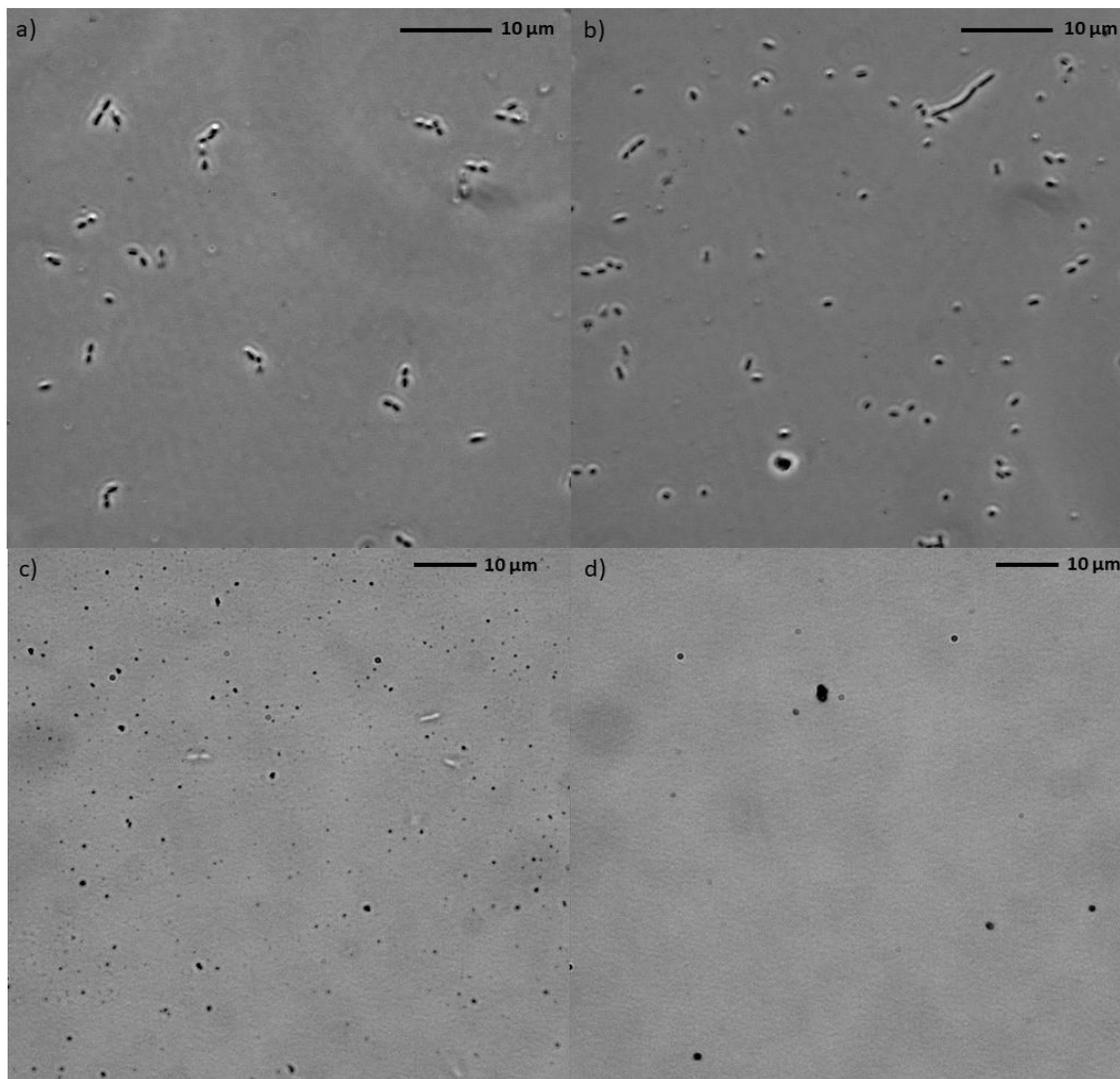


Fig. 5.7 - Illustrations photographiques d'échantillons bactériens positifs et de contrôles négatifs avec des billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées par différents anticorps

Observation au microscope brightfield/darkfield avec un objectif à immersion au grossissement 100X de différents échantillons de 1 mL en milieu LPG contenant : a) 10^7 bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 sans bille magnétique fonctionnalisée, b) 10^7 bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 en présence de 10^9 billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps Xantho5, c) 10^7 bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 en présence de 10^9 billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps non pertinent IpaD315 et d) en absence de bactérie, uniquement avec billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps Xantho5.

Après les 2 heures d'immunocapture, un contrôle visuel des échantillons est effectué au microscope Olympus brightfield/darkfield (la lumière ne traverse pas directement l'échantillon étudié, elle est réfléchiée sur l'échantillon. Le brightfield montre un agrandissement clair tandis que le darkfield montre des détails infimes). Un objectif à immersion au grossissement 100X est utilisé dans l'objectif de vérifier la labélisation

des bactéries par les billes magnétiques fonctionnalisées et d'observer l'état d'agrégation des billes magnétiques (notamment dans l'échantillon contrôle négatif composé uniquement de billes fonctionnalisées avec l'anticorps Xantho5 (Fig. 5.7).

Malgré le grossissement 100X, il est assez difficile d'observer la présence ou non de billes magnétiques en surface des bactéries (Fig. 5.7a et Fig. 5.7b). Pour mieux y parvenir, il serait astucieux d'ajouter sur ces billes commerciales un agent fluorescent afin de vérifier plus facilement la labélisation des bactéries par fluorescence (comme fait pour les billes du LITEN, paragraphe 3.4.2.3.7).

Pour tenter de vérifier autrement la bonne labélisation magnétique des bactéries par les billes Ademtech 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps Xantho5, des tests bandelettes ont été réalisés (paragraphe 1.2.2.1) (Fig. 5.8).

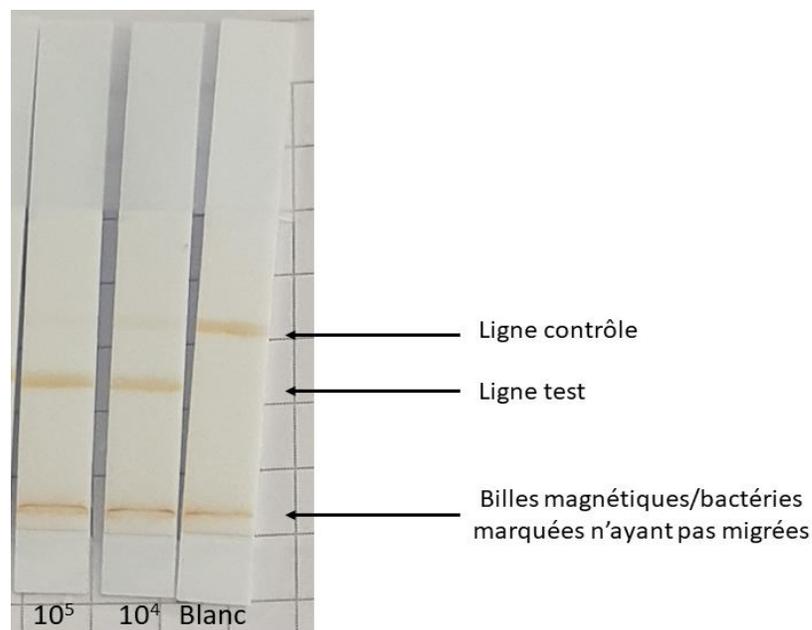


Fig. 5.8 - Contrôle par immunochromatographie de la labélisation magnétique des bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 par les billes Ademtech 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique Xantho5

10^5 = 100 μ L de solution à 10^5 CFU/mL en TpEIA + 0.5% tween20, 10^4 = 100 μ L de solution à 10^4 CFU/mL en TpEIA + 0.5% tween20; Blanc = 100 μ L de TpEIA + 0.5% tween20. A chacun de ces échantillons de 100 μ L sont ajoutés 2 μ L de billes Ademtech 200 nm fonctionnalisées par l'anticorps Xantho5, juste avant le dépôt sur bandelettes (Xantho5 immobilisé sur la ligne test et anticorps de chèvre anti-IgG de souris immobilisé sur la ligne contrôle).

L'idée est de contrôler que les billes fonctionnalisées par l'anticorps Xantho5 sont capables d'immunocapturer les bactéries *X. arboricola* CFBP 7634, la détection des complexes billes/bactéries se faisant ensuite visuellement au niveau de la ligne test par accumulation des billes magnétiques (couleur marron) présentes en surface des bactéries retenues par les anticorps Xantho5 immobilisés sur la ligne test. L'excès de billes magnétiques fonctionnalisées se lie à la ligne contrôle (sur laquelle sont immobilisés des anticorps chèvre anti-IgG de souris reconnaissant l'anticorps Xantho5 couplé en surface des billes).

Un témoin négatif « Blanc » constitué uniquement de billes Ademtech 200 nm fonctionnalisées, en absence de bactéries, permet de vérifier la spécificité de la détection au niveau de la ligne test de la bandelette. En pratique, 100 μ L de solution bactérienne à 0, 10^4 ou 10^5 CFU/mL en tampon EIA + 0,5 % de Tween20 sont déposées dans un puit d'une plaque 96 puits, puis 2 μ L de billes Ademtech 200 nm

fonctionnalisées à 10^9 billes/mL y sont ajoutées. Il suffit ensuite de déposer les bandelettes, préalablement préparées ([paragraphe 3.5.1](#)), dans les puits et d'attendre 15 minutes que la solution migre le long des bandelettes pour ensuite observer le résultat.

Les résultats de la [Fig. 5.8](#) ont été obtenus. Ils prouvent que les bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 sont bien labélisées magnétiquement par les billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées par l'anticorps Xantho5 (au moins en partie) puisqu'une ligne colorée marron apparaît au niveau de la ligne test. Ils démontrent aussi la présence non négligeable d'agrégats de billes magnétiques fonctionnalisées, de tailles conséquentes au point de ne pas pouvoir entrer et migrer dans la membrane de nitrocellulose (comme le dénote la ligne en bas de la bandelette « Blanc »). Enfin, cette expérience permet aussi de se rendre compte que l'excès de billes magnétiques n'est peut-être pas suffisant puisque la ligne contrôle est à peine visible en présence de 10^4 CFU/mL de bactéries et quasiment invisible pour 10^5 CFU/mL. Cette observation confirme le fait qu'il sera nécessaire de réaliser ultérieurement des mises au point pour déterminer la quantité optimale de billes nécessaires à la bonne labélisation magnétique des bactéries.

5.3.4. Mise en place de l'expérience

La mise en place des expériences est identique à celle pour la détection des cellules NS1 ([paragraphe 3.3.2](#)). Sur le volume disponible d'échantillon de 1 mL, 200 μ L sont introduits dans le canal microfluidique.

En général, les premiers échantillons analysés sont les échantillons tests (attendus positifs) passés en concentration croissante, pour terminer par les contrôles négatifs. L'inverse est également possible et cela démontre que l'ordre de passage n'est pas dérangeant pour les expériences.

Après le passage de chaque échantillon dans le canal, 200 μ L ou plus de milieu de culture liquide LPG sont introduits afin de récupérer les quelques signaux des bactéries éventuellement encore présentes dans les tubulures.

5.4. Résultats

Cinq expériences seulement ont été réalisées sur les bactéries dont deux ont été réalisées avec deux contrôles négatifs (1- billes fonctionnalisées avec anticorps non pertinent IpaD315 en présence de bactéries et 2- billes fonctionnalisées avec l'anticorps pertinent Xantho5 seules, en absence de bactérie) et trois avec un seul contrôle négatif. Comme il s'agit d'expériences préliminaires, le plan d'expérience n'est pas encore fixe. De plus, de nombreux problèmes ont été rencontrés comme des engorgements dus à la diminution de la hauteur de canal.

Les paramètres des cinq expériences sont récapitulés dans le [Tableau 5.3](#).

Tableau 5.3 - Paramètres des cinq expériences réalisées sur les bactéries avec les billes Adembeads 200 nm

Le descriptif des échantillons tests et contrôles négatifs est détaillé dans le Tableau 5.2.

Date de l'expérience	Nom de la biopuce	Hauteur du canal (µm)	Épaisseur SU-8 (µm)	Épaisseur NOA81 (µm)	Sensibilité des capteurs (% /mT)	Bruit moyen capteur haut (mV)	Bruit moyen capteur bas (mV)	Volume des échantillons (µL)	Gamme de concentration (CFU/mL)	Contrôle(s) négatif(s) utilisé(s)
25-11-2021	C2E21	7,6	1,7	5	1,96	49	61	200	10 ³ à 10 ⁷	IpaD315
13-01-2022	C2E21	7,6	1,7	5	1,69	56	58	200	10 ⁴ à 10 ⁷	Billes Xantho 5 IpaD315
14-01-2022	C2E21	7,6	1,7	5	1,69	48	44	200	10 ³ à 10 ⁵	Billes Xantho 5 IpaD3155
10-02-2022	C2E21	7,6	1,7	5	1,50	46	47	200	10 ⁶ à 10 ⁷	Billes Xantho 5
17-02-2022	C2E21	7,6	1,7	5	1,5	52	53	200	10 ³ à 10 ⁶	Billes Xantho 5

Dans le cas théorique d'un marquage parfait avec occupation stérique complète en surface des bactéries, entre 100 et 1600 billes se lieront par bâtonnet de bactérie (650 billes pour un diamètre moyen de 2,5 µm). Comme les billes Adembeads de 200 nm ont un moment magnétique plus faible ($1,27 \times 10^{-13}$ emu) que les billes Dynabeads 1 µm (ou même que les billes Micromod 500 nm) ([paragraphe 3.2.2.2](#)) et que la labélisation des bactéries par les billes fonctionnalisées peut varier de 100 à plus de 1000 billes, on s'attend à obtenir des signaux détectés plus faibles. Pour cette raison, il a été décidé que les coïncidences sélectionnées comprendront deux signaux dont l'amplitude est supérieure à une fois la limite de détection (LOD) (au lieu de deux fois la LOD pour les cellules NS1). Ainsi, lorsque le champ dipolaire de chaque capteur est tracé en fonction de la hauteur du canal ([Fig. 5.9](#)), on observe que les objets magnétiques des échantillons qui génèrent des coïncidences avec les critères d'amplitude imposés ne peuvent être que des objets magnétiques ou agrégats qui contiennent plus de 100 billes. La plupart des objets magnétiques donnant lieu à une coïncidence passent au centre du canal microfluidique. Une légère dissymétrie est visible du fait que les espaceurs du haut et du bas n'ont pas la même épaisseur (1,7 µm pour la SU-8 2002 (capteur du bas) et 5 µm pour la NOA (capteur du haut)) ([paragraphe 4.2.1.1](#)).

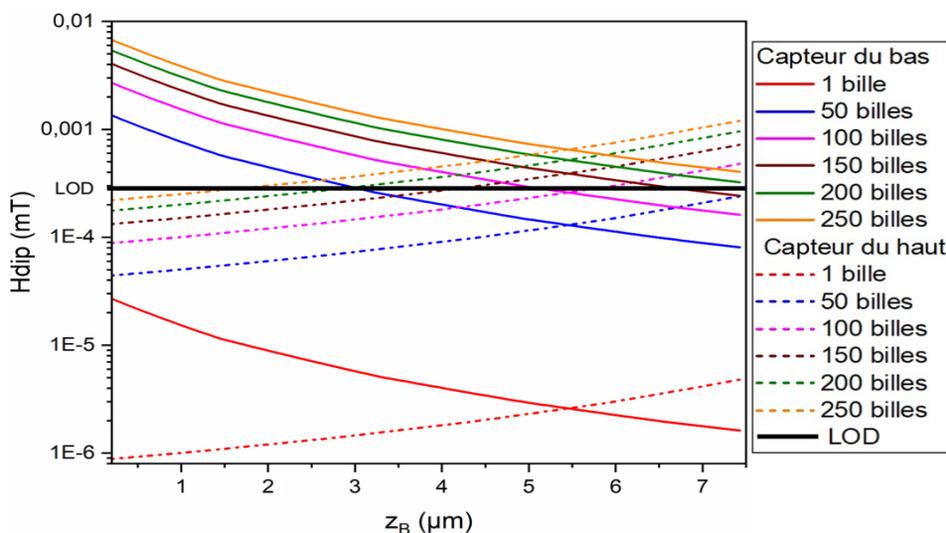


Fig. 5.9 - Champ dipolaire théorique calculé et produit simultanément sur le capteur du haut (traits pointillés) et du bas (traits pleins) par des objets magnétiques labélisés par un nombre variable de billes Adembeads 200 nm en fonction de leur hauteur de passage z_B (7,6 μm) dans le canal

La limite de détection LOD est indiquée par un trait noir gras (paragraphe 1.4.6.5).

Les cinq premières expériences réalisées sur les bactéries ont été réalisées dans un double objectif : i) celui de démontrer la faisabilité de détection de ces objets biologiques plus petits (i.e. preuve de concept d'une certaine versatilité de la biopuce GMR) et ii) celui d'identifier les principaux verrous et axes d'optimisation sur lesquels il sera nécessaire de travailler pour rendre la biopuce plus performante dans ce domaine d'application (i.e. définir les principaux enjeux et objectifs de la prochaine thèse).

La première constatation issue de ces cinq expériences concerne les problèmes d'engorgements dus à la diminution de la hauteur du canal : pour trois de ces cinq expériences, ces difficultés ont pu être rencontrées (exception : expériences du 25/11/2021 et du 13/01/2022), et presque exclusivement à fortes concentrations bactériennes (au-delà de 10^5). Une réflexion devra donc être menée pour envisager différentes solutions (test de différents pré-traitements de l'échantillon avant analyse sur la biopuce (dilution, traitement mécanique/microfluidique, etc.), poursuite de la recherche de la diminution de l'état d'agrégation des billes magnétiques fonctionnalisées, etc.).

Dès la première expérience préliminaire du 25 novembre 2021 (pour laquelle il n'y a pas eu d'engorgement mais ne comportant qu'un seul contrôle négatif, **Tableau 5.3 et Tableau 5.4**), la preuve de la faisabilité de détection des bactéries a pu être démontrée, comme plus amplement commenté ci-dessous et illustré avec la **Fig. 5.10**.

Tableau 5.4 - Paramètres expérimentaux pour les échantillons spécifiques et négatifs avec les billes Adembeads 200 nm

	Sensibilité des capteurs GMR (%/mT)		Bruit de sortie des capteurs GMR (mV pic à pic)		Gain
	Capteur du haut	Capteur du bas	Capteur du haut	Capteur du bas	
Echantillon spécifique	1,96	1,96	47	74	8600
Contrôle négatif	1,96	1,96	50	57	

Cette **Fig. 5.10** présente les paramètres extraits du traitement du signal (détaillé dans le **chapitre 2 -**) obtenus pour un échantillon positif et un contrôle négatif comme décrit précédemment (pour l'expérience du 25/11/21). Les coïncidences résultantes comprennent donc deux signaux dont l'amplitude est supérieure à une fois la limite de détection (LOD), c'est-à-dire à un rapport signal sur bruit (SNR) de 1.

La **Fig. 5.10A** montre le nombre de coïncidences en fonction de la hauteur d'écoulement z_B (7,6 μm ; hauteur totale du canal) obtenue pour les deux échantillons. Comme pour la détection des cellules NS1, dans le **chapitre 4 -**, le décalage en z dans l'histogramme, peut s'expliquer de deux manières :

- 1) Les objets magnétiques ne sont pas injectés latéralement dans le canal mais par le haut et ils ne passent donc pas tout à fait au centre.
- 2) L'estimation de l'épaisseur des espaceurs n'est pas tout à fait correct, en particulier celle de la NOA qui ne peut pas être mesurée pendant les expériences (**paragraphe 4.2.1.2**). Cet effet est d'autant plus visible que la hauteur h du canal est du même ordre de grandeur que l'épaisseur des espaceurs.

La **Fig. 5.10B** montre l'histogramme du nombre de coïncidences en fonction du nombre de billes par objets magnétiques (agrégats de billes ou bactéries marquées magnétiquement de façon non spécifique pour le contrôle négatif ; agrégats de billes et bactéries marquées dans l'échantillon positif). Une quantité plus importante de coïncidences a pu être détectée dans les échantillons tests contenant 10^7 CFU/mL de *X. arboricola* CFBP 7634 en présence de 10^9 billes fonctionnalisées par Xantho5 (histogramme rouge) par rapport au contrôle négatif contenant également 10^7 CFU/mL de *X. arboricola* CFBP 7634 mais en présence de 10^9 billes fonctionnalisées par l'anticorps non pertinent IpaD315 (histogramme noir). Cette observation est la preuve que la détection des bactéries est possible au moyen de la biopuce, même si cette première expérience préliminaire, comme les quatre suivantes, révèlent que de nombreuses mises au point et optimisations restent à faire pour mieux distinguer ces deux populations d'échantillons positifs et contrôles négatifs (i.e. améliorer la spécificité) et pour gagner en sensibilité de détection.

L'histogramme noir (contrôle négatif) montre que la majorité des agrégats de billes contient entre 150 et 500 billes, les événements au-delà de 500 billes étant bien plus rares. Ce premier résultat montre qu'il va

être important de persévérer dans la recherche de solution pour limiter l'état d'agrégation des billes fonctionnalisées, dans l'objectif de limiter le nombre d'évènements faux positifs.

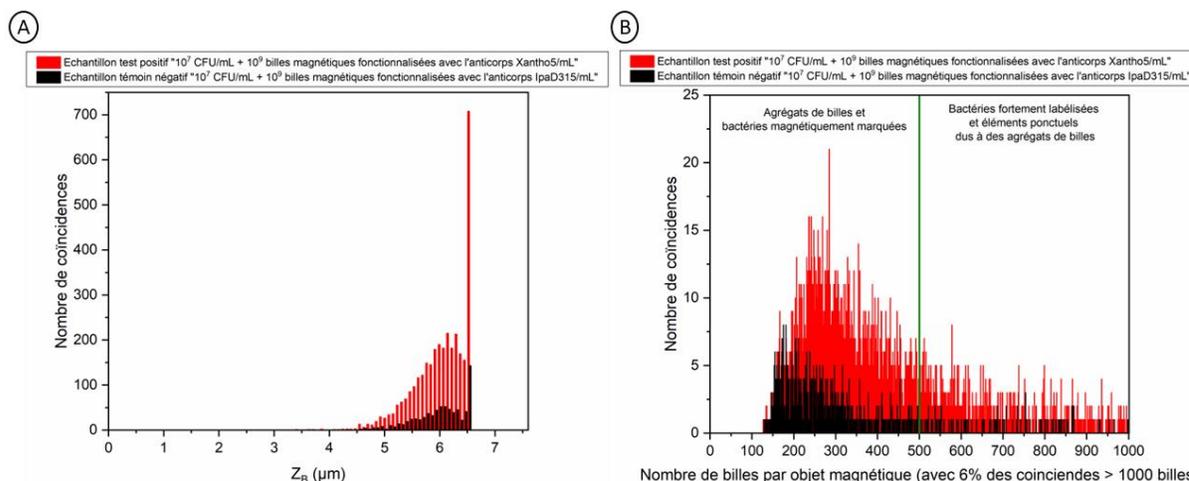


Fig. 5.10 - Histogramme du nombre de coïncidences en fonction de (A) la hauteur de passage dans le canal microfluidique Z_B ou (B) du nombre de billes par objet magnétique (agrégat de billes ou bactérie marquée) pour des expériences réalisées avec des billes Adembeads 200 nm

Nombre de coïncidences obtenues avec la biopuce GMR à deux étages après passage de 200 µL d'une solution de 1 mL de milieu de culture LPG contenant 10^7 CFU/mL *X. arboricola* CFBP 7634 mises en contact pendant 2 h à 20°C sous agitation avec i) 10^9 billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps Xantho5 (histogramme rouge) ou ii) 10^9 billes Adembeads 200 nm fonctionnalisées avec l'anticorps non pertinent IpaD315 (histogramme noir). Pour des raisons de lisibilité, les deux histogrammes de la figure Fig. 5.10B ont été tracés pour un nombre de billes par objets magnétiques (bactéries ou agrégats) n'excédant pas 1000 billes, même si les données rapportent que certains objets magnétiques (agrégats ou bactéries) sont labélisés jusqu'à 4000 billes (% de ces coïncidences extrêmes indiqué entre parenthèses).

Concernant l'échantillon positif (histogramme rouge), il contient la même concentration de billes (10^9 billes/mL) que dans l'échantillon négatif. Pour cet échantillon positif, la grande majorité des coïncidences enregistrées correspondent à des objets magnétiques contenant moins de 500 billes et ce nombre de coïncidences est bien plus important que pour l'échantillon négatif. Cela suggère que la majorité des bâtonnets de bactéries *X. arboricola* CFBP 7634 qui sont magnétiquement marqués le sont par moins de 500 billes (en moyenne 250-300 billes). Comme l'excès de billes magnétiques par rapport au nombre de bactéries n'est que d'un facteur 100 pour la concentration 10^7 CFU/mL de bactéries, cela peut suggérer qu'une certaine quantité de bactérie ne soit magnétiquement pas marquée (ou faiblement) et que la quantité optimale de billes nécessaire à la bonne labélisation magnétique des bactéries soit à optimiser.

Sur cette Fig. 5.10B, on peut également observer un plus grand nombre de coïncidences correspondant à des objets magnétiques contenant plus de 500 billes pour l'échantillon positif (histogramme rouge) que pour l'échantillon négatif (histogramme noir). Vu que, théoriquement, un marquage magnétique parfait avec occupation stérique complète correspond à 650 billes/bâtonnet de bactérie (si l'on considère qu'un bâtonnet a un diamètre moyen de 2,5 µm) en moyenne, ces objets correspondent certainement à des bâtonnets de bactéries labélisés (en plus de quelques rares gros agrégats de billes).

Pour avoir une représentation visuelle plus simple et globale de l'ensemble des tests réalisés lors d'une expérience entière (gamme de concentration de *X. arboricola* CFBP 7634 en plus des témoins négatifs), nous avons décidé, pour ces expériences préliminaires, de se fixer un seuil arbitraire de 500 billes par objet. Comme nous avons pu le voir sur la Fig. 5.10B, la très grande majorité des évènements faux positifs (agrégats de billes et marquage non spécifique des bactéries) contiennent moins de 500 billes (histogramme

noir). Nous allons donc considérer, de façon arbitraire, que seules les coïncidences générées par plus de 500 billes par objet correspondent à des bactéries magnétiquement labélisées.

Les analyses qui en découlent sont présentées sur la **Fig. 5.11**.

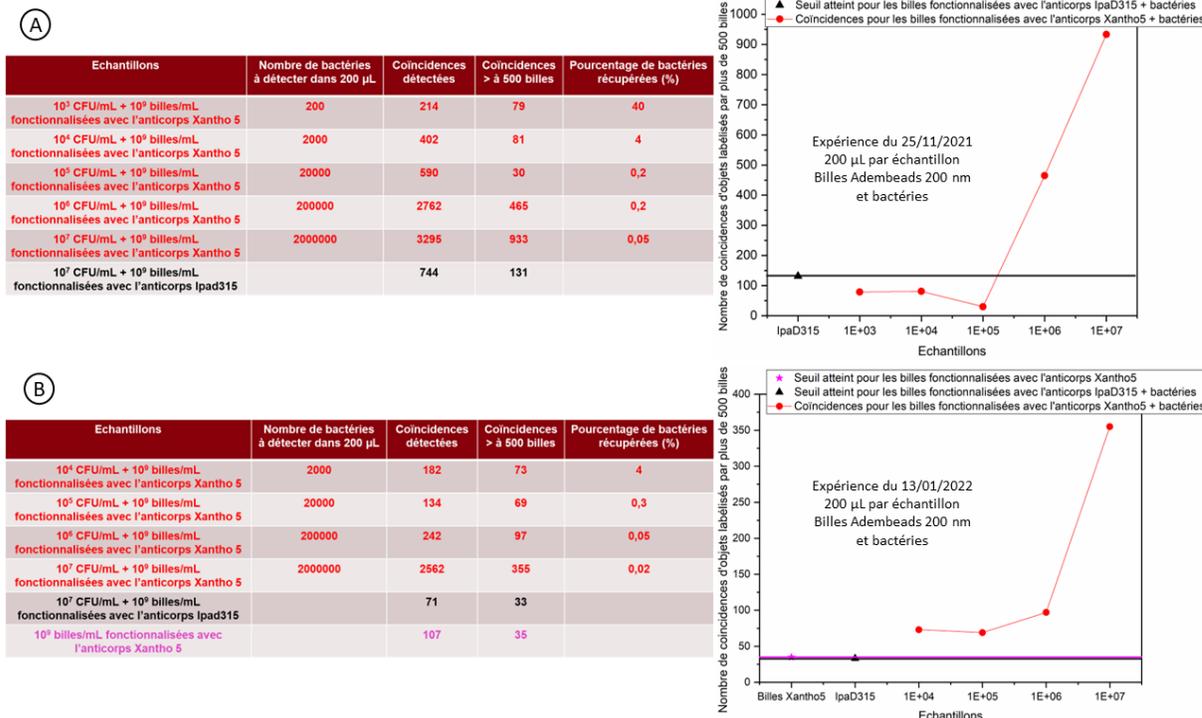


Fig. 5.11 - Résultats de deux expériences réalisées pour la détection des bactéries à l'aide des billes Adembeads 200 nm
A : Expérience du 25-11-21. B : Expérience du 13-01-22.

Nous pouvons constater que le pourcentage d'évènements détectés dans ces conditions par la biopuce est très faible par rapport à la quantité attendue (dernière colonne des tableaux). Cela s'explique au moins en partie par :

- Un marquage magnétique probablement peu optimal et à améliorer (quantité de billes, durée d'immunocapture, protocole de fonctionnalisation des billes, etc.).
- Les objets bactériens détectés peuvent être des bactéries individuelles magnétiquement labélisées, mais aussi des bâtonnets de bactéries constitués de plusieurs entités (deux à cinq bactéries, comme on peut d'ailleurs l'observer sur les photographies présentées en **Fig. 5.7**).
- Le seuil arbitraire à 500 billes, qui est peu favorable, et qui pourra être diminué de façon concomitante à la réduction de l'état d'agrégation des billes.
- A cela s'ajoute la quantification approximative de la concentration bactérienne dans la solution de départ, puisque basée sur la mesure de la turbidité à 600 nm (et non pas sur un véritable dénombrement).

Tous ces points confirment bien que des mises au point et optimisations doivent être apportées, objet principal de la thèse à venir.

Malgré toutes ces limites, les résultats des deux expériences préliminaires présentées en **Fig. 5.11** sont prometteurs puisque démontrant la faisabilité de la détection de bactéries (au-delà de 10^6 CFU/mL pour le modèle *X. arboricola* CFBP 7634).

5.5. Conclusion

L'étude de la détection de la bactérie dans ces travaux de thèse n'est qu'une ébauche, des mises au point sont nécessaires afin d'obtenir des résultats plus sensibles et reproductifs, permettant une évaluation complète et précise des performances de détection des bactéries. Toutefois, ces premiers essais préliminaires prouvent la versatilité potentielle du domaine d'application de la biopuce GMR.

De plus, des billes conçues sur mesure par le LITEN (**paragraphe 3.4.2.3**) pour ce genre d'étude pourraient nettement améliorer la détection notamment par l'ajout d'un agent fluorescent afin de vérifier si les bactéries sont marquées correctement.

5.6. Références

- [1] Au cœur de l'ADN. SEMAE Pédagogie n.d. <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/coeur-adn/>.
- [2] Cesbron S, Briand M, Essakhi S, Gironde S, Boureau T, Manceau C, et al. Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. *Front Plant Sci* 2015;6:1126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>.
- [3] Gram HCJ, Friedlaender C. *Über die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt- und Trockenpräparaten.* Berlin: Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung; 1884.
- [4] Brock TD. *Milestones in Microbiology 1546 to 1940.* ASM Press; 1999.
- [5] Structure de la paroi des bactéries | Portail pédagogique académique n.d. <https://pedagogie.ac-montpellier.fr/structure-de-la-paroi-des-bacteries>.
- [6] Javillier Maurice, Polonovski Michel, Florkin Marcel. *Traité de biochimie générale / M. Javillier, M. Polonovski, M. Florkin... [et al.]; secrétaires de la rédaction P. Boulanger et J. Polonovski. Tome III Premier fascicule. Les processus biochimiques de synthèse et de dégradation Énergétique biochimique et cycles des éléments.* Paris: Masson et Cie éditeurs; 1967.
- [7] Mahmood T, Yang P-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4:429–34. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- [8] Weiss A, Mobberley-schuman P, Fernandez R, Mink M. Characterization of Human Bactericidal Antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 1999;67:1424–31. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.3.1424-1431.1999>.
- [9] Kałużna M, Fischer-Le Saux M, Pothier JF, Jacques M-A, Obradović A, Tavares F, et al. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: Brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology, and insights for disease management. *Molecular Plant Pathology* 2021;22:1481–99. <https://doi.org/10.1111/mpp.13073>.

6 - Conclusion



Maikane DEROO

C'est souvent à l'interface entre différentes disciplines que naissent de nouveaux concepts innovants et de nouvelles recherches. C'est à la rencontre entre les phénomènes physiques de magnétisme et le domaine de l'immunodétection en biologie, et grâce à une collaboration féconde entre ces deux mondes, qu'est né le concept d'un nouvel outil de diagnostic qui pourrait répondre de façon optimale aux critères ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid/Robust, Equipment-free, Deliverable to end-users) définis par l'Organisation mondiale de la Santé.

Il s'agit d'une technologie utilisant des particules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre la cible biologique d'intérêt, permettant un comptage unitaire, au moyen d'une biopuce à base de capteurs GMR. Après avoir conçu, développé et breveté une telle biopuce basée sur des capteurs magnétorésistifs disposés de part et d'autre d'un canal microfluidique afin de détecter dynamiquement une à une des cibles biologiques marquées magnétiquement, nous avons réalisé une étude complète sur un modèle biologique de cellules de myélome murin (NS1) immunocapturées par des billes magnétiques commerciales afin d'évaluer les performances de ce nouveau dispositif comme potentiel outil de diagnostic précoce.

Nous avons tout d'abord rappelé la fabrication ainsi que le principe de détection de cette technique. Nous avons également mis en place un protocole expérimental et réalisé plusieurs optimisations afin d'améliorer les performances de ce nouveau prototype. Plusieurs paramètres ont pu être étudiés au cours de ces travaux et notamment l'immunocapture des cellules par les billes magnétiques ainsi que l'état d'agrégation de ces billes.

Différentes expériences biologiques telles que la labélisation des cellules dans différents milieux biologiques, la labélisation par différents types et quantités de billes fonctionnalisées avec différents anticorps spécifiques ont pu être réalisées afin de tenter d'améliorer l'immunocapture des cellules. Quant à l'état d'agrégation des billes magnétiques, des protocoles de sonication et de fragmentation des anticorps ont été réalisés afin de réduire au maximum les agrégats de billes, principal verrou de ces travaux. Toutes ces expériences ont donc permis de rechercher les conditions optimales permettant de bien différencier les objets biologiques d'intérêt des agrégats de billes et donc éviter au maximum les faux positifs. Ainsi, les conditions d'immunocapture et d'agrégation s'avèrent être les meilleures pour une immunocapture des cellules NS1 par des billes commerciales de 1 μm fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 dans un volume déterminé de milieu de culture.

Nous avons ensuite évalué un ensemble de critères, tels que la sensibilité, la spécificité, la répétabilité, la robustesse mais aussi la rapidité, la facilité d'utilisation et la versatilité, qui permettent de caractériser les performances de ce test de diagnostic.

La sensibilité de détection de ce test a pu être déterminée par la réalisation de plus d'une cinquantaine d'expériences (pour une certaine répétabilité) en suivant un plan d'expérience précis comprenant une gamme de concentrations allant de 10^2 à 10^5 cellules/mL en présence de billes fonctionnalisées par l'anticorps anti-CD138 spécifique aux cellules NS1 et correspondant aux échantillons positifs puis deux contrôles négatifs ont également été réalisés. Un premier contrôle négatif est composé de billes magnétiques seules fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique aux cellules NS1 à la même concentration que dans les échantillons positifs et le deuxième contrôle est quant à lui composé également de billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps spécifique aux cellules NS1 à la même concentration que dans les échantillons positifs mais cette fois en présence d'un souche cellulaire non pertinente mimant parfaitement les conditions réelles d'un test de diagnostic. Cette nouvelle biopuce a donc permis d'atteindre une sensibilité jusqu'à 100 cellules/mL en milieu de culture soit un gain d'un facteur 100 à 300 par rapport au premier prototype de biopuce GMR à un étage.

La spécificité a également été améliorée par rapport à la biopuce GMR à un étage grâce à la présence des deux capteurs alignés de part et d'autre du canal microfluidique nous permettant de qualifier l'objet

magnétique détecté par des informations sur sa hauteur de passage dans le canal microfluidique, le nombre de bille à sa surface et donc son moment magnétique nous permettant ainsi de préciser sa nature (agrégat de billes ou cellule magnétiquement marquée), ce qui était impossible avec le premier prototype. Ces données nous sont fournies par un programme Python de traitement des données (breveté) nous permettant, après avoir renseigné les caractéristiques de l'expérience, d'obtenir toutes les informations de détection des objets biologiques, rendant ce dispositif interactif et facile d'utilisation.

De plus, un grand nombre d'expériences a été réalisé dans du milieu de culture, qui est un milieu bien plus complexe que le PBS utilisés pour qualifier les performances de la première biopuce GMR, se rapprochant ainsi davantage de la réalité d'un test de diagnostic en matrice complexe. Ceci a permis de démontrer une certaine robustesse du système.

Ce dispositif est également rapide et permet de réaliser une expérience complète (quatre ou cinq échantillons tests positifs et deux témoins négatifs) en une durée totale allant de 3 h à 6 h selon le volume de l'échantillon (temps d'immunocapture de 2 h + 10 minutes pour 200 μ L et 45 minutes pour 1 mL).

Et pour finir, des premiers essais ont été réalisés sur des bactéries démontrant la preuve de concept de la détection de ces objets biologiques plus petits. Il s'agit d'une grande avancée par rapport au premier prototype développé et utilisé uniquement sur un modèle de cellules eucaryotes.

Ce nouveau prototype a également été comparé aux tests de diagnostic déjà présents sur le marché comme les tests bandelettes, ELISA et la cytométrie en flux. Elle est compétitive par rapport à ces autres méthodes et ses forces reposent sur son potentiel à détecter les objets un par un et l'absence de lavage.

La biopuce GMR à deux étages ne cible pas les mêmes objets biologiques que les tests immunochromatographiques. En effet, celle-ci peut détecter de gros objets (cellule, bactérie), ce que ne peut faire ou fait difficilement les tests bandelettes qui sont davantage adaptés à la détection d'objets plus petits (bactéries, virus, protéine). Cependant ces tests sont, comme la biopuce GMR à deux étages, faciles d'utilisation, réalisables sur le terrain et sans lavage.

Elle est également 10 à 100 fois plus sensible qu'un ELISA réalisé sur une cible cellulaire identique car ce prototype est capable de détecter les objets un à un, alors que le test ELISA détecte une amplification d'une quantité globale minimale. Les autres avantages de cette biopuce comparés à l'ELISA est qu'elle ne nécessite pas de personnel qualifié, pas d'étapes de lavage et qu'il s'agit d'une technologie transportable.

Quant à la cytométrie en flux, il s'agit du même principe de détection (i.e. détection des objets un à un). Mais la cytométrie requiert des étapes de lavage car non réalisable dans des milieux opaques ou colorés. C'est certainement ce point qui explique que la biopuce est 10 à 30 fois plus sensible que la cytométrie pour détecter une même cible eucaryote. La biopuce reste également plus facile à utiliser que la cytométrie qui nécessite un personnel expert et qui se réalise uniquement en laboratoire de recherche.

Toutefois, bien que cette biopuce GMR à deux étages soit très performante, il a été observé que les cellules sont en moyenne récupérées à 40 % à la fin de l'expérience pour les faibles concentrations comparées aux concentrations élevées où le rendement peine à atteindre les 20 %. Ce dispositif semble donc être adapté pour du diagnostic précoce. Cependant, ce rendement n'est pas optimal et il en va de même pour les bactéries où les rendements récupérés sont encore plus faibles. Ces faibles rendements peuvent être d'ordre biologique et/ou magnétique.

Des optimisations sont donc nécessaires et permettraient de gagner en sensibilité et spécificité, pour cela plusieurs solutions peuvent être envisagées :

- Réduire l'état d'agrégation des billes magnétiques fonctionnalisées [1] [2] [3]. Des billes conçues spécialement pour ce projet et faisant l'objet d'un brevet sont en cours de développement. Elles permettraient de diminuer l'agrégation, d'augmenter l'immunocapture mais aussi l'observation microscopique de la bonne labélisation des bactéries par les billes en y ajoutant un élément fluorescent à leur surface.

- Réduire l'état d'agrégation des objets biologiques magnétiquement marqués (i.e. réduire les clusters de cellules/bactéries) [4].
- Augmenter le volume à analyser.
- Améliorer la qualification des objets en branchant plusieurs couples de capteurs. Actuellement, un seul couple de capteur haut et bas est utilisé pour la détection, or la biopuce en contient quatre au total, on pourrait donc envisager d'utiliser un deuxième couple de capteur branché en série avec le premier afin de pouvoir contrôler, suivre la détection et déterminer la vitesse des objets magnétiques.
- Envisager un multiplexage [5] [6] [7]. Distinguer un signal différent pour deux types de billes différentes, fonctionnaliser deux types de billes avec deux anticorps différents afin de détecter simultanément deux cibles biologiques présentes en même temps dans un échantillon.
- Bien que les premiers tests sur les bactéries aient permis de démontrer la versatilité de la biopuce, des mises au point sont cependant à prévoir concernant l'immuno-capture des billes magnétiques par les bactéries (quantité de billes, type de billes (commerciales/sur-mesure), fonctionnalisation des billes, outils de contrôle visuel, quantification plus précise des bactéries par dénombrement, ajouter systématiquement des contrôles négatifs adaptés, etc.).

D'autres optimisations portant sur le laboratoire sur puce en tant qu'outils de diagnostic au chevet du patient sont à prévoir :

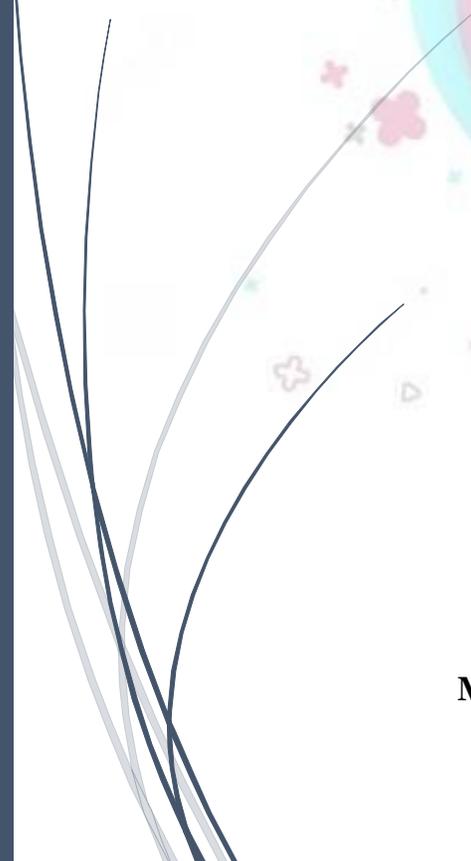
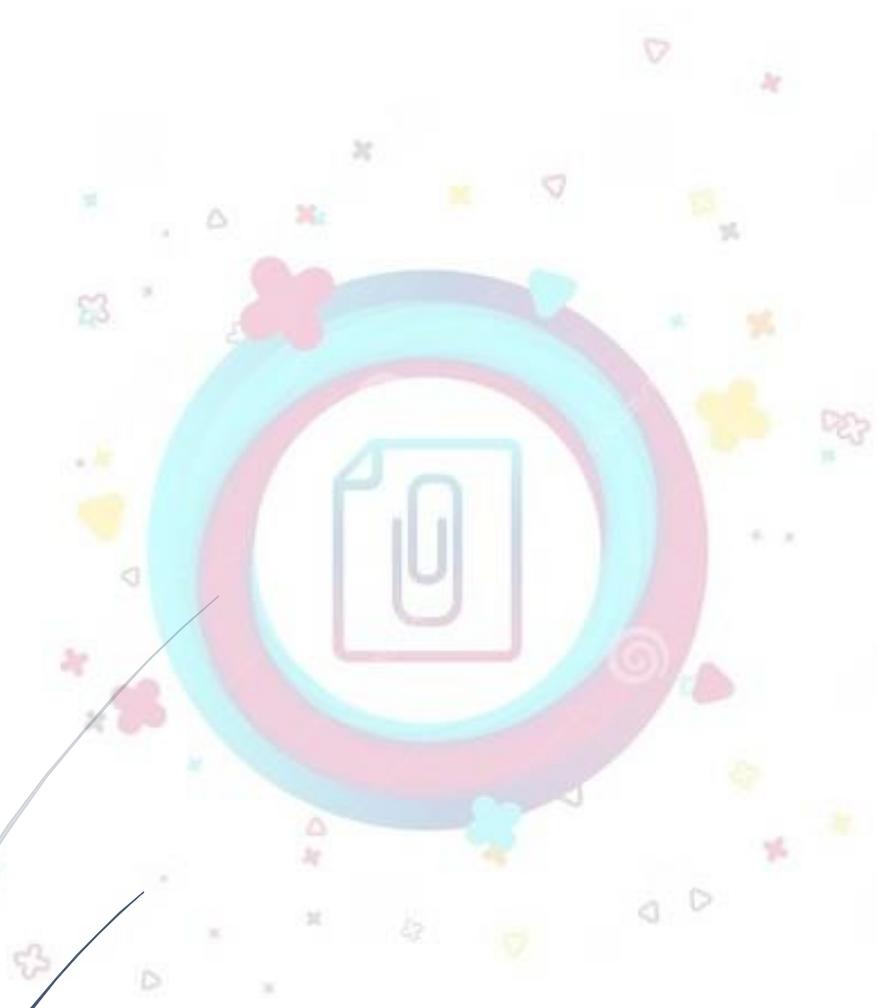
- La portabilité de la biopuce avec parties jetables et d'autres réutilisables par stérilisation. Ceci permettrait de faire des tests en laboratoire de haute sécurité microbiologique L2 en travaillant sur un nouveau modèle bactérien, cette fois-ci pathogène, avec intérêt applicatif. Une troisième thèse sera entièrement dédiée aux mises au point de ce laboratoire sur puce pour la détection des bactéries à l'aide de la souche non pathogène *X. arboricola* puis ce test de diagnostic pourrait être utilisé pour des bactéries pathogènes pour l'homme comme les bactéries *Escherichia coli* responsables d'infections urinaires, *Yersinia enterocolitica* ou *Salmonella* retrouvées dans l'eau et les aliments ou encore les bactéries *Legionella pneumophila* responsable de la légionellose (maladie respiratoire). De nos jours, il n'existe pas de méthodes rapides afin de détecter la présence des bactéries *L. pneumophila*. Il faut compter entre 48 heures (société C4Hydro) [8] [9] et 10 jours pour les détecter et les dénombrer en respectant les normes sanitaires, et donc confirmer la présence de ces bactéries. Or la légionellose est une maladie qui peut s'avérer mortelle. C'est pourquoi des méthodes de détection plus rapides sont un enjeu capital au niveau de la santé mais aussi au niveau économique où les lieux soupçonnés d'être contaminés par cette bactérie sont fermés tout au long du processus de détection.
- La miniaturisation du laboratoire sur puce en remplaçant l'aimant actuel par un aimant homogène plus petit [10].
- Le traitement des données en temps réel en utilisant un nano-ordinateur sur batterie comme par exemple un Raspberry [11].

6.1. Références

- [1] Illés E, Tombácz E. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 2006;295:115–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.08.003>.
- [2] Baalousha M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Science of The Total Environment* 2009;407:2093–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.022>.
- [3] Hoshiar AK, Le T-A, Amin FU, Kim MO, Yoon J. A Novel Magnetic Actuation Scheme to Disaggregate Nanoparticles and Enhance Passage across the Blood–Brain Barrier. *Nanomaterials* 2018;8:3. <https://doi.org/10.3390/nano8010003>.
- [4] Marrella A, Fedi A, Varani G, Vaccari I, Fato M, Firpo G, et al. High blood flow shear stress values are associated with circulating tumor cells cluster disaggregation in a multi-channel microfluidic device. *PLOS ONE* 2021;16:e0245536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245536>.
- [5] Klein T, Wang W, Yu L, Wu K, Boylan KLM, Vogel RI, et al. Development of a multiplexed giant magnetoresistive biosensor array prototype to quantify ovarian cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 2019;126:301–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.046>.
- [6] Gao Y, Huo W, Zhang L, Lian J, Tao W, Song C, et al. Multiplex measurement of twelve tumor markers using a GMR multi-biomarker immunoassay biosensor. *Biosens Bioelectron* 2019;123:204–10. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.060>.
- [7] Cunha AP, Henriques R, Cardoso S, Freitas PP, Carvalho CM. Rapid and multiplex detection of nosocomial pathogens on a phage-based magnetoresistive lab-on-chip platform. *Biotechnol Bioeng* 2021;118:3164–74. <https://doi.org/10.1002/bit.27841>.
- [8] Kit de Test Legionella pneumophila, Analysez votre réseau d'eau en 48h. C4Hydro - Kit Détection de la Legionella pneumophila dans l'Eau en 48h n.d. <https://c4hydro.com/>.
- [9] La détection des légionelles dans l'eau gagne en vitesse. *Actu-Environnement* n.d. <https://www.actu-environnement.com/ae/news/detection-legionelles-eau-33237.php4>.
- [10] Raich H, Blümler P. Design and construction of a dipolar Halbach array with a homogeneous field from identical bar magnets: NMR Mandhalas. *Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering* 2004;23B:16–25. <https://doi.org/10.1002/cmr.b.20018>.
- [11] Sharma D, Samuel K, Ramoutar K, Lowe T, David I. Raspberry Pi Based Real Time Data Acquisition Node for Environmental Data Collection. *Journal of Basic and Applied Engineering Research* 2017;4:307–12.



7 - Annexes



Maikane DEROO

7.1. Annexe A - Fiche produit SU-8 2002 et 2007

MICRO • CHEM

www.microchem.com

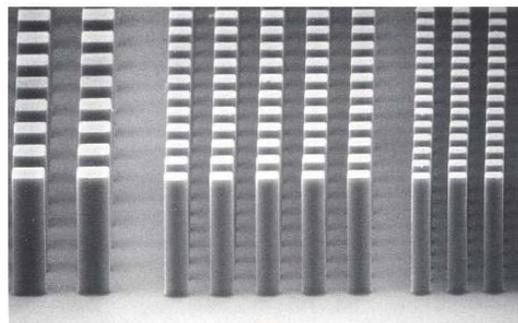
SU-8 2000

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

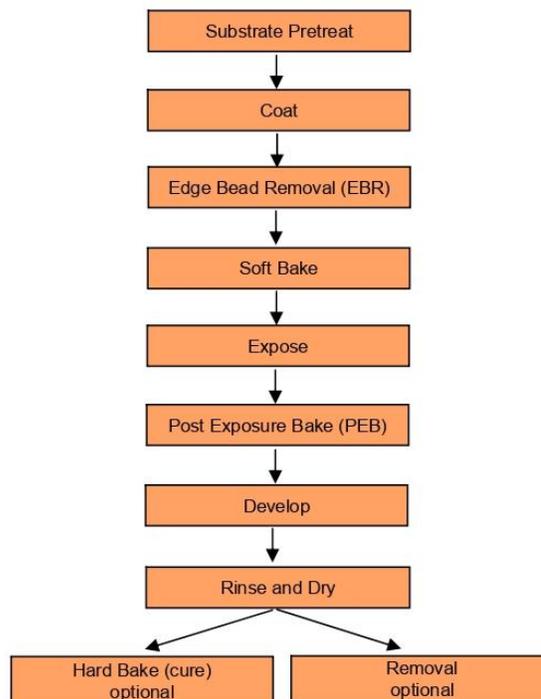
SU-8 2000 Features

- 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 H_2SO_4 & H_2O_2) 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

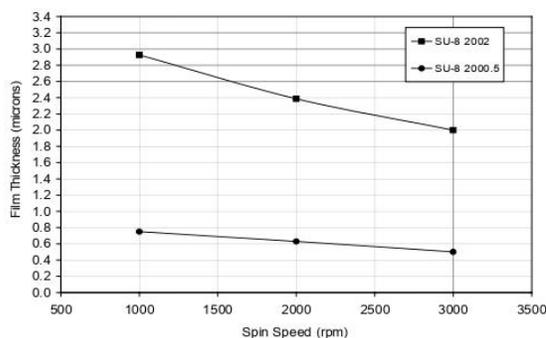


Figure 1.b. SU-8 2000 Spin Speed vs. Thickness

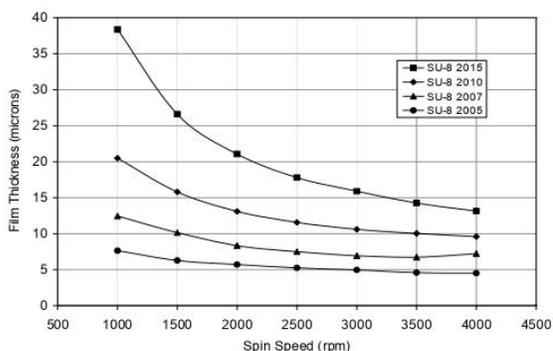


Table 1. SU-8 2000 Viscosity

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.

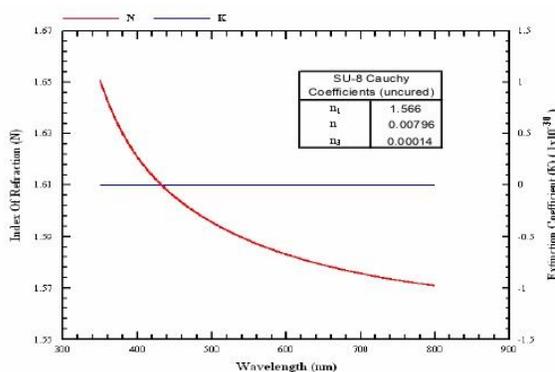


Figure 3. Cauchy Coefficients

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	DEVELOPMENT
microns	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.

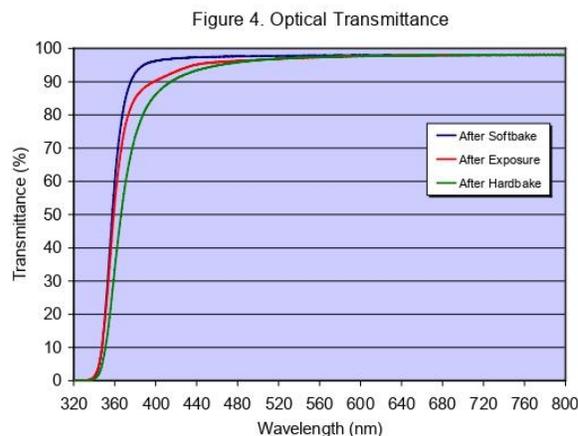
Physical Properties

(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



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

7.2. Annexe B - Fiche produit SU-8 2025

MICRO • CHEM

www.microchem.com

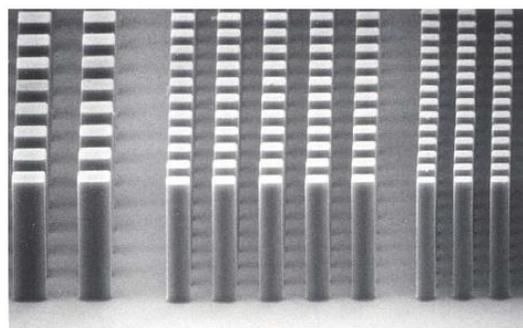
SU-8 2000

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

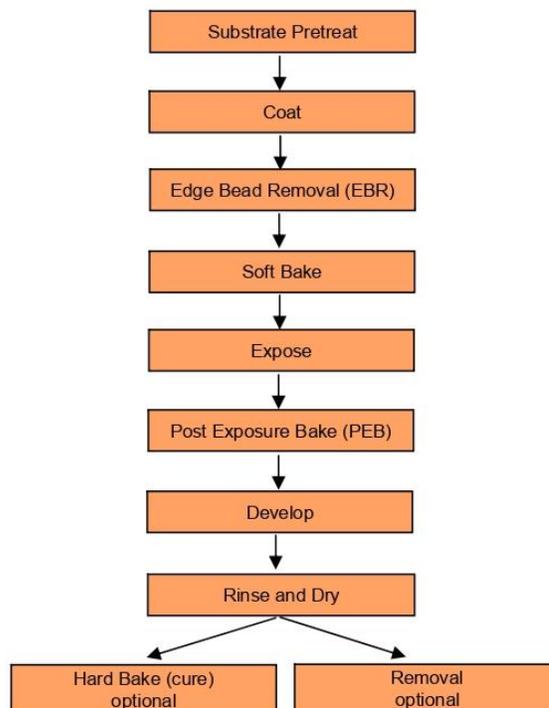
SU-8 2000 Features

- 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





www.microchem.com

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 H_2SO_4 & H_2O_2) 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.

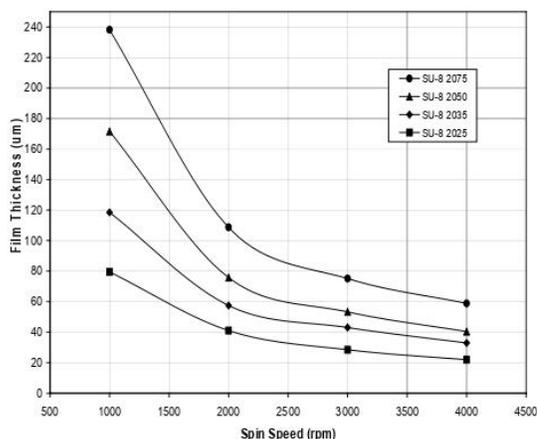
Coat

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.

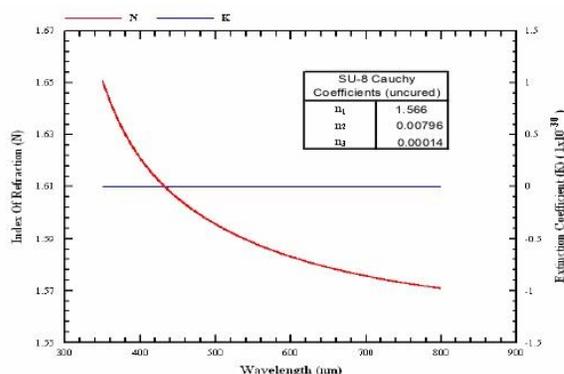


Figure 3. Cauchy Coefficients

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	EXPOSURE ENERGY
microns	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	PEB TIME (65°C)*	PEB TIME (95°C)
microns	minutes	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.

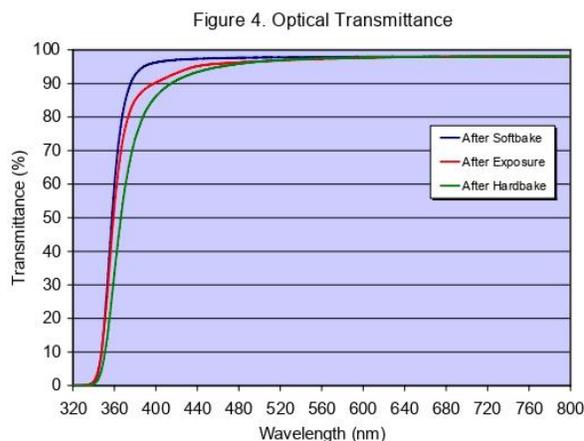
Physical Properties

(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



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

7.3. Annexe C - Fiche produit NOA81



NORLAND PRODUCTS INCORPORATED

1095 Cranbury South River Road, Suite 20, Jamesburg, NJ 08831

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.

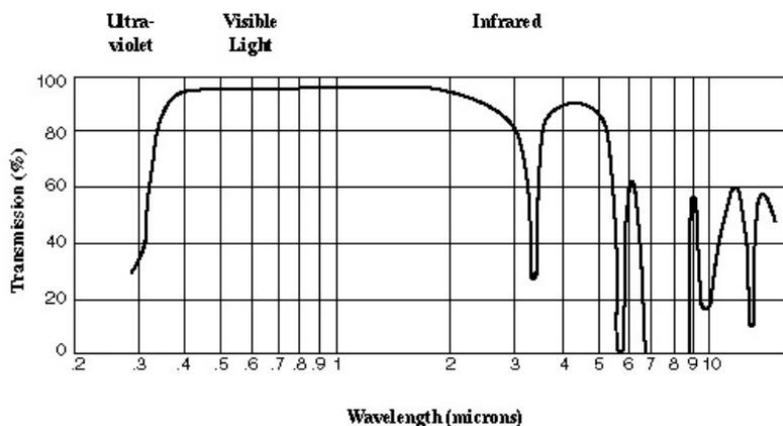
NOA 81 cures from the surface down and longer cures are required for thicker films to allow UV light to penetrate to the full depth. After curing, it has very good adhesion to glass, metals, printed circuit boards and other glass filled plastics. This adhesion improves with age with optimum adhesion 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.

7.4. Annexe D - Fiche produit des billes Adembeads 200 nm



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% NaCl.

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

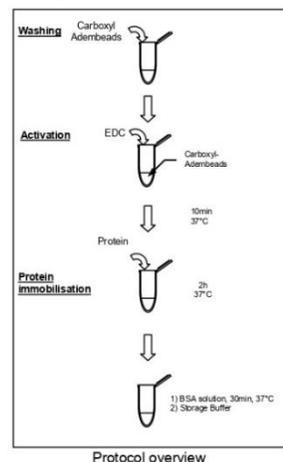
Carboxyl-Adembeads are designed to act as solid support for a wide variety of biomagnetic separations and manipulations.

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 2.6

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 Albumin (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 MODULO, 12x1.5 ml/2ml (# 20105)

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

Precautions should be taken to prevent bacterial contamination of protein-coated Adembeads. If cytotoxic preservatives are added these must be carefully removed before use by washing.

WARNINGS AND LIMITATIONS

For in vitro research only. Not for use in human diagnostic or therapeutic procedures.

Sodium azide is toxic if ingested. **Avoid pipetting by mouth.** Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. When disposing through plumbing drains, flush with large volumes of water to prevent azide buildup.

WARRANTY

The products are warranted to the original purchaser only to conform to the quality and contents stated on the vial and outer labels for duration of the stated shelf life.

Ademtech's obligation and the purchaser's exclusive remedy under this warranty is limited either to replacement, at Ademtech's expense, of any products which shall be defective in manufacture, and which shall be returned to Ademtech, transportation prepaid, or at Ademtech's option, refund of the purchase price. Claims for merchandise damaged in transit must be submitted to the carrier.

Ademtech SA – Bioparc BioGalen - 27, allée Charles Darwin - 33600 PESSAC – France www.ademtech.com

Version 2.6

7.5. Annexe E - Fiche produit des billes Micromod 500 nm

Überarbeitet am 01.06.2022, Version 5.01



TECHNISCHES DATENBLATT

www.micromod.de
 (T) + 49 381 / 7999 7000
 (F) + 49 381 / 7999 7070
 Email-Adresse: info@micromod.de

micromod Partikeltechnologie GmbH
 Schillingallee 68
 D-18057 Rostock
 Germany

Produktnummer:	05-19-502
Produktname:	nanomag@-CLD
Oberfläche:	streptavidin
Durchmesser	500 nm
Konzentration:	10 mg/ml
Partikeltyp:	vernetzte Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel
Polydispersitätsindex:	< 0.2
Form:	clusterförmig
Dichte:	2.5 g/ccm
Magnetisierung:	47 Am ² /kg Eisen (H = 80 kA/m)
Sättigungsmagnetisierung:	>70 Am ² /kg Eisen (H > 800 kA/m)
Koerzitivfeld Hc:	0.677 kA/m
Stabil in:	wässrigen Pufferlösungen pH > 4
Nicht stabil in:	organischen Lösungsmitteln, sauren Lösungen pH < 4
Produktform:	Suspension in PBS-Puffer (pH = 7.4), stabilisiert in 0.02 % Natriumazid
Partikel pro ml:	6.1 E10
Partikel pro mg:	6.1 E9
Farbe:	dunkelbraun
Weitere Anmerkungen:	Lagerung bei 2 - 8 °C, Haltbarkeit: 3 Monate

7.6. Annexe F - Fiche produit des billes Dynabeads 1 micromètre

invitrogen

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1

Catalog Nos. 65601, 65602, 65604D

Store at 2°C to 8°C

Publication No. MAN0015761

Rev. C.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 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.

The 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

- 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.

General guidelines

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

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

- Resuspend the beads in the vial (i.e., vortex for >30 sec, or tilt and rotate for 5 min).
- Transfer the desired volume of 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 beads in a volume of Washing Buffer equal to the initial volume of 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.

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 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 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 Beads.

For examples of immobilization protocols for specific applications, see "Immobilize nucleic acids" or "Immobilize antibodies/proteins".

1. Wash the beads as directed in "Wash Dynabeads™ MyOne™ magnetic beads" (see page 1).
2. Add the biotinylated molecule to the washed 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.

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 Beads share similar properties to Dynabeads™ M-280 Streptavidin Beads 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 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
 ©2018 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

14 June 2018

ThermoFisher
SCIENTIFIC

7.7. Annexe G - Fiche produit du kit Pierce

INSTRUCTIONS

Thermo
SCIENTIFIC

Pierce™ F(ab')₂ Preparation Kit

44988

Pub. No. MAN0017019

Rev. A.0

Pub Part No. 2162089.7

Number	Description
44988	<p>Pierce F(ab')₂ Preparation Kit, contains sufficient reagents to generate and purify F(ab')₂ fragments from up to 10 0.5mL samples containing 0.25-4mg of IgG</p> <p>Kit Contents:</p> <p>Immobilized Pepsin, 1.25mL settled resin, contains 2-3mg (> 6000 units) of pepsin per milliliter of settled resin; support is 6% crosslinked beaded agarose supplied as a 50% slurry in 50% glycerol, 0.1M sodium acetate, pH 4.4; 0.05% sodium azide</p> <p>NAb™ Protein A Plus Spin Column, 1mL, 1 each, binding capacity: ≥ 34mg of human IgG per column</p> <p>BupH™ Phosphate Buffered Saline, 2 packs, makes 1L of 0.1M sodium phosphate, 0.15M sodium chloride; pH 7.2</p> <p>IgG Elution Buffer, 120mL, pH 2.8, contains primary amine</p> <p>Spin Columns, 10 each, 0.8mL columns with 10 caps and 11 bottom plugs</p> <p>Microcentrifuge Tubes, 30 each, 2.0mL collection tubes</p> <p>Digestion Buffer, 120mL, 20mM sodium acetate, pH 4.4; 0.05% sodium azide</p> <p>Zeba™ Spin Desalting Columns, 2mL, 10 each, for 200-700µL samples</p>

Storage: Upon receipt store kit at 4-8°C. Kit is shipped at ambient temperature.

Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ F(ab')₂ Preparation Kit enables efficient generation of F(ab')₂ from IgG. This kit uses Immobilized Pepsin, a nonspecific endopeptidase that is active only at acid pH and irreversibly denatured at neutral or alkaline pH. Pepsin digestion typically produces a F(ab')₂ fragment (~110kDa by SDS-PAGE under non-reducing conditions) and numerous small peptides of the Fc portion (Figure 1). The resulting F(ab')₂ fragment is composed of a pair of Fab' units connected by two disulfide bonds. The Fc fragment is extensively degraded and can be separated from F(ab')₂ by dialysis, gel filtration or ion exchange chromatography.

This kit contains the necessary components for F(ab')₂ generation and subsequent purification. Immobilized Pepsin is advantageous because the digestion can be immediately stopped by simply removing the resin from the antibody digest solution. The included Spin Columns allow easy manipulation of the resin and maximum F(ab')₂ recovery. The prepacked, immobilized Thermo Scientific™ NAb™ Protein A Plus Spin Column binds the large Fc fragments and undigested IgG, allowing the F(ab')₂ fragments to pass through the column for efficient purification. This complete kit makes F(ab')₂ generation and purification simple, fast and effective.



Figure 1. Schematic for preparing F(ab')₂ using Immobilized Pepsin and Protein A.

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747
(815) 968-7316 fax

thermofisher.com

Important Product Information

- Proper sample preparation is essential for successful fragment generation using this kit. If the IgG sample contains a carrier protein such as BSA, use the Thermo Scientific Pierce Antibody Clean-up Kit (Product No. 44600) to remove it before performing the buffer exchange (Section B).
- For best results, use rabbit, human or mouse IgG. Fragmentation of IgG from other species may require optimization. For purification, the IgG species must be able to bind to Protein A. For best results with mouse IgG₁, use the Pierce IgG₁ Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Product No. 44980).
- The kit components and protocol are for 0.5mL samples containing 250µg-4mg of IgG per sample. For 25-250µg samples use the Pierce F(ab')₂ Micro Preparation Kit (Product No. 44688).

Additional Materials Required

- Incubator capable of maintaining 37°C
- Microcentrifuge capable of 5000 × g
- Variable speed centrifuge
- 15mL conical collection tubes
- End-over-end mixer or tabletop rocker

Material Preparation

Phosphate-buffered Saline (PBS): Dissolve contents of a package in 500mL of ultrapure water. For long-term storage, add 0.05% sodium azide and store at 4°C.

Procedure for Generating and Purifying F(ab')₂ Fragments

A. Immobilized Pepsin Equilibration

1. Gently swirl the Immobilized Pepsin vial to obtain an even suspension. Seat the spin column frit with an inverted 200µL pipette tip.
2. Twist off the bottom tab from a 0.8mL spin column and place into a 2.0mL microcentrifuge tube. Using a wide-bore or cut pipette tip, place 0.25mL of the 50% slurry (i.e., 0.125mL of settled resin) into the 0.8mL spin column. Centrifuge the column at 5000 × g for 1 minute and discard buffer.
3. Wash resin with 0.5mL of Digestion Buffer. Centrifuge column at 5000 × g for 1 minute and discard buffer. Cap bottom of spin column with included rubber cap.

B. IgG Sample Preparation

1. Twist off the bottom closure of a Zeba Spin Desalting Column and loosen cap. Place column in a 15mL collection tube.
2. Centrifuge column at 1000 × g for 2 minutes to remove storage solution. Place a mark on the side of the column where the compacted resin is slanted upward. Place column in centrifuge with the mark facing outward in all subsequent centrifugation steps.

Note: Resin will appear compacted after centrifugation.

3. Add 1mL of Digestion Buffer to column. Centrifuge at 1000 × g for 2 minutes to remove buffer. Repeat this step three additional times, discarding buffer from the collection tube.
4. Place column in a new collection tube, remove cap and slowly apply 0.5mL of sample to the center of the compacted resin bed.
5. Replace cap and centrifuge at 1000 × g for 2 minutes to collect the sample. Discard the column after use.
6. If IgG sample is 0.5-8mg/mL (i.e., 250µg to 4mg), no further preparation is necessary. If sample volume is less than 0.5mL, add Digestion Buffer to a final volume of 0.5mL.

C. Fragment Generation

1. Add 0.5mL of the prepared IgG sample to the spin column containing the equilibrated Immobilized Pepsin (Section A). Place top cap and bottom plug on the spin column.
2. Incubate digestion reaction for the appropriate time (see the Appendix) with an end-over-end mixer or a tabletop rocker at 37°C. Maintain constant mixing of resin during incubation.
3. Remove bottom cap and place column into a 2.0mL microcentrifuge tube. Centrifuge column at $5000 \times g$ for 1 minute to separate digest from the Immobilized Pepsin.
4. Wash resin with 0.5mL of PBS. Place column into a tube and centrifuge at $5000 \times g$ for 1 minute. Repeat this step once.
5. Add both wash fractions to the digested antibody. Total sample volume should be 1.5mL. Discard the Immobilized Pepsin.

Note: For best results, evaluate the digest and wash fraction via SDS-PAGE to assess digestion completion. Protein A purification is only required to remove undigested IgG. F(ab')₂ and degraded Fc do not bind to Protein A. The resulting F(ab')₂ in non-reducing SDS-PAGE derived from human and mouse IgG will migrate with an apparent molecular weight of ~110kDa. Rabbit F(ab')₂ will migrate with a lower apparent molecular weight of ~88kDa.

D. F(ab')₂ Purification

1. Equilibrate the NAb Protein A Plus Column, PBS and IgG Elution Buffer to room temperature. Set centrifuge to $1000 \times g$.
2. Loosen the top cap on the NAb Protein A Plus Spin Column and snap off the bottom closure. Place column in a 15mL collection tube and centrifuge for 1 minute to remove storage solution (contains 0.02% sodium azide). Discard the flow-through.
3. Equilibrate column by adding 2mL of PBS. Centrifuge for 1 minute and discard the flow-through. Repeat this step once.
4. Cap bottom of column with the included rubber cap. Apply sample to column and cap the top tightly. Resuspend the resin and sample by inversion. Incubate at room temperature with end-over-end mixing for 10 minutes.
5. Loosen top cap and remove bottom cap. Place column in a new 15mL collection tube and centrifuge for 1 minute. Save the flow-through as this fraction contains F(ab')₂ and Fc fragments that are too small to bind to Protein A.
6. For optimal recovery, wash column with 1mL of PBS. Centrifuge for 1 minute and collect flow-through. Repeat and combine wash fractions with the F(ab')₂ fraction from Step 5.
7. Measure protein concentration using the Thermo Scientific™ BCA Protein Assay or by measuring the absorbance at 280nm. Use an estimated extinction coefficient of 1.4. Assuming complete IgG digestion, F(ab')₂ yields may vary from 50 to 70%, depending on the amount of starting antibody and the protein assays used.
8. If desired, perform dialysis (50K MWCO), gel filtration or ion-exchange chromatography to remove the Fc fragments that are too small to bind to Protein A.

E. Regeneration of the Immobilized NAb Protein A Plus Spin Column

1. Apply 1mL of IgG Elution Buffer to the NAb Protein A Plus Spin Column and centrifuge for 1 minute. Repeat this step two times to obtain three fractions, which will contain undigested IgG. To save the undigested IgG, add 100µL of a neutralization buffer (e.g., 1M phosphate or 1M Tris at pH 8-9) to each of the elution fractions.
2. Add 3mL of IgG Elution Buffer to the column and centrifuge for 1 minute. Discard flow-through and repeat.
3. Add 3mL of PBS to the column and centrifuge for 1 minute.
4. For storage, add 3mL of 0.02% sodium azide in PBS to column. Replace top and bottom caps. Store column upright at 4°C. Columns can be regenerated at least 10 times without significant loss of binding capacity.

Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
Low amounts of F(ab') ₂ produced as determined by non-reducing SDS-PAGE	IgG sample was not in Digestion Buffer	Dialyze or buffer exchange IgG into Digestion Buffer, or decrease the Digestion Buffer pH to 3-4.3 [note that decreasing the pH might increase the F(ab') ₂ amount produced but can reduce its immunoreactivity]
	Sample loading buffer contains reducing reagent	Use SDS loading buffer that does not contain β-mercaptoethanol, DTT or TCEP
	Resin was not equilibrated in Digestion Buffer before adding IgG	Wash resin with 0.5mL of Digestion Buffer before adding IgG sample
	Sample is goat or mouse IgG ₁	Reduce IgG concentration and increase digestion time to 8 hours
	Some mouse IgG ₁ are resistant to pepsin cleavage ¹	Use the Pierce IgG ₁ Fab and F(ab') ₂ Preparation Kit (Product No. 44980 or 44680)
	Sample contains protein other than IgG (e.g., BSA), which can increase digestion time	Remove BSA with the Pierce Antibody Clean-up Kit (Product No. 44600)
F(ab') ₂ has low immunoreactivity	Sample digested for too long	Reduce digestion time; do not exceed 8 hours
	The low pH of Digestion Buffer decreased F(ab') ₂ activity	Use the Pierce IgG ₁ Fab and F(ab') ₂ Preparation Kit
Low F(ab') ₂ recovery	Incomplete washing of the pepsin resin	Two 500μL washes of PBS are required for maximum recovery
A portion of undigested IgG does not bind to Protein A	Sample is goat or mouse IgG ₁	Goat IgG binds weakly to Protein A, so try an alternative purification method such as ion-exchange
		Dilute sample in Pierce Protein A Binding Buffer (Product No. 21001) before adding to the Protein A Column

Appendix

Recommended Digestion Times

This kit is for digesting 0.5mL of IgG at 0.5-8mg/mL from rabbit, human or mouse. Digestion effectiveness will vary depending on antibody preparation and source (rate and completeness of digestion: rabbit > human > mouse ≥ goat). The times listed in Table 1 result in > 90% digestion of IgG. Data was generated using serum purified by immobilized Protein A or G affinity chromatography. Digestion over 8 hours is not recommended.

Table 1. Recommended digestion times for various species and concentrations of IgG.

Species	IgG (mg/mL)	Digestion Time
		(hours)
Rabbit	8	2
	3.5	1-2
	1.5	0.5
	0.5	0.5
Human	5.0	6-7
	2.5	3-4
	1.0	2-3
	0.5	1-2
Mouse	5.0	6-7
	2.5	2-3
	1.0	0.5-1
	0.5	0.5-1

Related Products

90009	Pierce Strong Cation Exchange Spin Column, Maxi , 8 spin columns and 16 collection tubes
90011	Pierce Strong Anion Exchange Spin Column, Maxi , 8 spin columns and 16 collection tubes
89868	Pierce Centrifuge Columns, 0.8mL , 50 units
89956	NAb Protein A Plus Spin Columns, 1mL
44688	Pierce F(ab')₂ Micro Preparation Kit
44985	Pierce Fab Preparation Kit , uses Immobilized Papain to prepare Fab fragments from IgG
44685	Pierce Fab Micro Preparation Kit
44980	Pierce IgG₁ Fab and F(ab')₂ Preparation Kit , uses Immobilized Ficin, optimized for mouse IgG ₁
44680	Pierce IgG₁ Fab and F(ab')₂ Micro Preparation Kit
23225	Pierce BCA Protein Assay Kit , sufficient to perform 500 standard tube assays
44600	Pierce Antibody Clean-up Kit
XP04200BOX	Novex™ Tris-Glycine protein gels (see thermofisher.com/proteingels for a complete listing)

General References

- Beale, D. (1987). Molecular fragmentation: Some applications in immunology. *Exp Comp Immunol* **11**:287-96.
- Ellerson, J.R., *et al.* (1972). A fragment corresponding to the CH2 region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity. *FEBS Letters* **24**(3):318-22.
- Kerbel, R.S. and Elliot, B.E. (1983). Detection of Fc receptors. *Meth Enzymol* **93**:113-147.
- Kulkarni, P.N., *et al.* (1985). Conjugation of methotrexate to IgG antibodies and their F(ab')₂ fragments and the effect of conjugated methotrexate on tumor growth *in vivo*. *Cancer Immunol Immunotherapy* **19**:211-4.
- Lamoyi, E. (1986). Preparation of F(ab')₂ Fragments from mouse IgG of various subclasses. *Meth Enzymol* **121**:652-663.
- Parham, P., *et al.* (1982). Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *J Immunol Meth* **53**:133-73.
- Raychaudhuri, G., *et al.* (1985). Human IgG₁ and its Fc fragment bind with different affinities to the Fc receptors on the human U937, HL-60 and ML-1 cell lines. *Mol Immunol* **22**(9):1009-19.
- Rousseaux, J., *et al.* (1980). The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Mol Immunol* **17**:469-82.
- Rousseaux, J., *et al.* (1983). Optimal condition for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Meth* **64**:141-6.
- Wilson, K.M., *et al.* (1991). Rapid whole blood assay for HIV-1 seropositivity using a Fab-peptide conjugate. *J Immunol Meth* **138**:111-9.

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

Products are warranted to operate or perform substantially in conformance with published Product specifications in effect at the time of sale, as set forth in the Product documentation, specifications and/or accompanying package inserts ("Documentation"). No claim of suitability for use in applications regulated by FDA is made. The warranty provided herein is valid only when used by properly trained individuals. Unless otherwise stated in the Documentation, this warranty is limited to one year from date of shipment when the Product is subjected to normal, proper and intended usage. This warranty does not extend to anyone other than Buyer. Any model or sample furnished to Buyer is merely illustrative of the general type and quality of goods and does not represent that any Product will conform to such model or sample.

NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE GRANTED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE, OR NON INFRINGEMENT. BUYER'S EXCLUSIVE REMEDY FOR NON-CONFORMING PRODUCTS DURING THE WARRANTY PERIOD IS LIMITED TO REPAIR, REPLACEMENT OF OR REFUND FOR THE NON-CONFORMING PRODUCT(S) AT SELLER'S SOLE OPTION. THERE IS NO OBLIGATION TO REPAIR, REPLACE OR REFUND FOR PRODUCTS AS THE RESULT OF (I) ACCIDENT, DISASTER OR EVENT OF FORCE MAJEURE, (II) MISUSE, FAULT OR NEGLIGENCE OF OR BY BUYER, (III) USE OF THE PRODUCTS IN A MANNER FOR WHICH THEY WERE NOT DESIGNED, OR (IV) IMPROPER STORAGE AND HANDLING OF THE PRODUCTS.

Unless otherwise expressly stated on the Product or in the documentation accompanying the Product, the Product is intended for research only and is not to be used for any other purpose, including without limitation, unauthorized commercial uses, *in vitro* diagnostic uses, *ex vivo* or *in vivo* therapeutic uses, or any type of consumption by or application to humans or animals.

Current product instructions are available at thermofisher.com. For a faxed copy, call 800-874-3723 or contact your local distributor.

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All (other) trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Printed in the USA.

Pierce Biotechnology
3747 N. Meridian Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105 USA

(815) 968-0747
(815) 968-7316 fax

thermofisher.com

7.8. Annexe H - Fiche produit du bioanalyseur Agilent 2100



Une plate-forme –
d'infinies
possibilités pour les analyses
d'ADN, d'ARN, de protéines et de cellules



Bioanalyseur Agilent 2100

Our measure is your success.

produits | applications | logiciels | services

 **Agilent Technologies**

Bioanalyseur Agilent 2100

Technologie appliquée de laboratoire-sur-puce

Le bioanalyseur Agilent 2100 constitue la méthode standard pour le contrôle qualité des échantillons d'ARN et remplace dans ce domaine l'électrophorèse sur gel qui demandait beaucoup de travail. Il est aussi en passe de se substituer à l'électrophorèse sur gel pour l'analyse de fragments d'ADN et l'analyse des protéines par la méthode SDS-PAGE. L'une des caractéristiques spécifiques du bioanalyseur Agilent 2100 est sa capacité à effectuer à la fois des séparations par électrophorèse et les analyses des paramètres de fluorescence des cellules en cytométrie de flux. Grâce à cette souplesse, le bioanalyseur Agilent 2100 est devenu l'outil indispensable du biologiste moléculaire et du biochimiste.

La miniaturisation de l'instrumentation analytique présente un grand nombre d'avantages par rapport aux techniques traditionnelles. Ces avantages tiennent principalement à l'amélioration de la précision et de la reproductibilité des données, à la faible durée des analyses, à la consommation minimale d'échantillon et à l'amélioration de l'automatisation et de l'intégration des analyses dans les processus complexes. Lancé en 1999, le bioanalyseur Agilent 2100 fut le premier instrument commercialisé à utiliser la microfluidique pour l'analyse d'échantillons biologiques.



Deux configurations sont proposées :

- Bioanalyseur Agilent 2100 à cartouches remplaçables, pour l'électrophorèse et la cytométrie de flux.
- Bioanalyseur par électrophorèse Agilent 2100 à cartouches remplaçables, pour électrophorèse uniquement.

Les deux configurations comprennent :

1. une base d'amorçage de la puce,
2. un agitateur de type vortex pour la puce,
3. le logiciel expert Agilent 2100 pour le pilotage de l'instrument et l'analyse des données (avec options d'extension prenant en charge les éventuelles exigences réglementaires),
4. des services et une assistance pour le système et ses applications.

2

Une large palette d'applications

Un système compact unique, avec des kits prêts à l'emploi

Le bioanalyseur Agilent 2100 combine avantageusement un ensemble de kits d'analyse prévalidés et un appareil de paillasse simple à l'emploi

- Cytométrie de flux sur puce
Une méthode facile pour l'acquisition de données de fluorescence de cellules en mode bicolore
- Contrôle qualité ARN avec facteur d'intégrité RIN
La norme de l'industrie en matière d'analyse ARN pour l'obtention des données d'ARN total, ARNm et petits ARN, utilisant notamment les algorithmes reposant sur les facteurs d'intégrité (algorithmes RIN)
- Longueur et quantité d'ADN
Séparation à haute résolution et quantification intelligente de l'ADN
- Méthodes de remplacement des analyses de protéines SDS-PAGE
Une manière rapide et fiable de déterminer la quantité et la pureté de protéines couvrant la gamme de sensibilité du bleu de Coomassie à l'argent



Le bioanalyseur Agilent 2100 : analyse rapide, automatisée avec des données de toute première qualité

- Kits de dosage prêts à l'emploi et kits de réactifs préconditionnés
- Consommation minimale d'échantillon (1 à 4 µl) et obtention des résultats en 30 minutes
- Cartouche à électrode interchangeable évitant les effets de mémoire entre méthodes
- Précision et exactitude des dosages améliorées
- Résultats identiques d'un laboratoire à l'autre
- Analyse, archivage et stockage des données facilités par leur numérisation
- Différentes options de visualisation, p. ex. type gel, électrophorégrammes ou tableaux
- La comparaison simplifiée des échantillons facilite l'utilisation
- Exposition minimale aux substances dangereuses
- Conforme au code 21 CFR Part 11

3

Utilisation facile

Comparaison simplifiée des échantillons

1. Rapide et simple d'emploi

Chargez l'échantillon



- Kits de réactifs prêts à l'emploi.
- Instructions de prise en main rapide.
- Préparation de la puce en moins de cinq minutes.
- Utilisation minimale de produits chimiques dangereux et élimination des déchets.
- Quelques μL d'échantillon suffisent.

2. Automatisation

Démarrez l'analyse



- Démarrage par pression d'un bouton.
- Protocoles prédéfinis.
- Utilisation d'un étalonnage interne pour le calcul des résultats.
- Analyse automatique de 12 échantillons maximum.

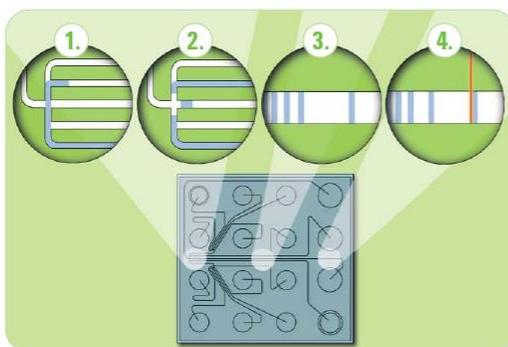
3. Résultats numériques en 30 minutes

Suivez l'affichage en temps réel



- Analyse automatisée des données.
- Les données numériques peuvent être partagées avec d'autres applications ou programmes.
- L'interprétation des données est indépendante de l'utilisateur.
- Algorithme RIN pour le contrôle qualité de l'ARN.

Principe de fonctionnement du laboratoire-sur-puce



1. L'échantillon se déplace dans les microcanaux depuis le puit d'échantillon.
2. L'échantillon est injecté dans le canal de séparation.
3. Les composants de l'échantillon sont séparés par électrophorèse
4. Les composants sont détectés par leur fluorescence et les résultats sont présentés sous une forme comparable à celle d'un gel (bandes) et à un électrophérogramme (pics).

Logiciel expert Agilent 2100

Comment tirer le meilleur parti de vos données numériques

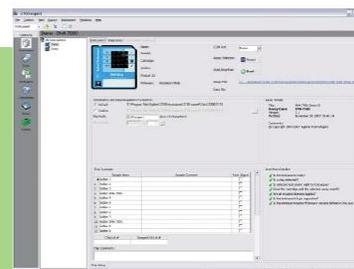
Un logiciel puissant au service des analyses d'ARN, d'ADN, de protéines et de cellules

Le logiciel expert 2100 d'Agilent est l'outil unique spécifiquement développé pour le système du bioanalyseur. S'appuyant sur les générations passées de logiciels pour bioanalyseurs, il offre la souplesse de la plate-forme expert 2100 intégrée, combinée à des fonctions soigneusement conçues pour vous aider à tirer le meilleur parti de vos données numériques.

Résumé des avantages

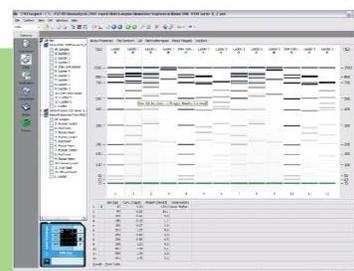
- Outils puissants d'évaluation des données et plate-forme unique pour tous les dosages.
- Algorithme fondé sur un facteur d'intégrité RIN (RNA Integrity Number) unique, permettant une évaluation non biaisée de l'intégrité de l'ARN total.
- Prêt à la conformité - le logiciel prend en charge des services de validation des systèmes (QI et QO) et les exigences du code 21 CFR Part 11, grâce au progiciel de sécurité en option.
- Outil de codage coloré des résultats – Un système facile à utiliser, fondé sur des règles, pour une évaluation des données et un contrôle qualité automatisés.
- Les tableaux et graphiques utilisés pour présenter les résultats de façon souple permettent un pilotage aisé de l'instrument et la prise en charge de modes utilisateur standard et avancé.
- Les fonctions de superposition, mise à l'échelle et de zoom sur simple clic permettent de comparer rapidement jusqu'à 48 échantillons, sur une même ou plusieurs puces.
- Formats multiples des données pour l'exportation, pour un échange aisé des données.
- Le logiciel de visualisation des données gratuit permet l'évaluation hors ligne et le partage des données.
- Outils de diagnostic efficaces intégrés permettant de réduire la durée d'indisponibilité du système.
- Analyse de traînée améliorée pour les échantillons d'ARN, ADN et de protéines.
- Format de fichier XML natif permettant l'intégration transparente des données d'une plate-forme et d'un projet à l'autre.

La saisie de l'échantillon, le choix de la méthode et le démarrage de l'analyse s'effectuent via une interface utilisateur conviviale et intuitive, qui permet de piloter les instruments 2100.



Configurez et démarrez

Les diverses options d'affichage, ici le format bandes de gel, s'accompagnent de tableaux contenant des informations complémentaires facilitant l'analyse des résultats.



Analysez et comparez

L'utilisateur peut facilement ajuster les rapports en fonction de ses besoins particuliers. Le codage par couleurs des résultats permet de voir directement si certains résultats spécifiques se trouvent bien dans les limites de tolérance.



Imprimez les rapports

5

Logiciel expert 2100 d'Agilent

Votre tranquillité d'esprit dans les environnements réglementés

Votre processus de validation pris en charge de A à Z

Pour les scientifiques qui travaillent dans un environnement réglementé, le logiciel expert 2100 d'Agilent prend en charge les logiciels et le matériel QI et QO/VP dans un contexte spécialisé de validation.



“ Je crois qu'Agilent fournit la gamme de services de conformité et de validation la plus complète au monde. Elle offre des solutions globales, multi-fournisseur, multiproduit qui permettent de résoudre virtuellement tous les problèmes de conformité avec un numéro d'appel unique. ”

Dr. Ludwig Huber, Expert international en conformité

Les outils et services logiciels d'Agilent ouvrent pour vous la voie de la conformité

Les sociétés de biopharmacie supportent les coûts et la charge de travail supplémentaires occasionnés par le contrôle qualité et la conformité aux réglementations. Pour pouvoir assurer la conformité, les modes opératoires de laboratoire et de production doivent être normalisés et reproductibles, tout en respectant les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Agilent contribue à assurer la sécurité des consommateurs en réduisant l'effort que doivent fournir les entreprises biopharmaceutiques pour mettre en place un contrôle de qualité fiable et normalisé, grâce au bioanalyseur Agilent 2100. Agilent prend en charge le processus de validation avec la documentation QD et les outils et services de QI et QO/VP. Le progiciel de sécurité du bioanalyseur Agilent 2100 prend en charge toutes les exigences du code 21 CFR Part 11. Cela comprend la manipulation des enregistrements électroniques, l'intégrité et la sécurité des données ainsi que la traçabilité des audits. Le logiciel expert 2100 d'Agilent est indispensable pour le fonctionnement du progiciel expert de sécurité 2100.

DÉFINITION

Qualification de la définition

DQ

Qualification de la définition (DQ)

La DQ définit les caractéristiques fonctionnelles et opérationnelles du système bioanalyseur 2100 et assure qu'il atteint tous les critères indispensables de performance. Les documents fournis avec le système bioanalyseur 2100 comprennent :

- Une déclaration de la validation du système.
- Une déclaration de conformité de l'instrument aux spécifications de fabrication.

INSTALLATION

Qualification de l'installation

IQ

Qualification de l'installation (IQ)

La IQ assure que l'instrument bioanalyseur Agilent 2100 et le logiciel expert 2100 sont installés correctement à la livraison.

MISE EN ROUTE

Qualification opérationnelle

OQ

Qualification opérationnelle (OQ)

La OQ est le processus démontrant qu'un instrument fonctionnera selon ses spécifications opérationnelles dans l'environnement prévu.

Qualification des performances (PQ)

Les clients sont responsables de la PQ qui démontre que le bioanalyseur 2100 fonctionne selon des spécifications compatibles avec son utilisation en routine et produit des données fiables, reproductibles et homogènes.

UTILISATION

Qualification des performances

PQ

6

Service d'assistance instrument et applications

Réparation sous 24 heures, extension de garantie et services d'assistance aux applications et à la conformité

Services et assistance relatifs aux matériels et logiciels

Tous les composants du bioanalyseur Agilent 2100 bénéficient d'une garantie usine d'un an. L'instrument bioanalyseur 2100 est couvert par un service de réparation de premier plan fonctionnant avec soit un échange express de l'instrument dans les 24 heures, soit un retour en atelier avec prêt d'un instrument. Le temps d'indisponibilité est ainsi réduit au minimum. Pour garantir la disponibilité de l'instrument, la garantie d'origine peut être étendue selon l'une des modalités suivantes :

- Extension de garantie d'une ou de plusieurs années pour la plupart des composants du système bioanalyseur Agilent 2100 (dont le PC, l'imprimante, et le logiciel) et service d'échange express de l'instrument. En outre, cette extension de garantie comprend une maintenance préventive (MP) annuelle du système.
- Extension de garantie d'une ou de plusieurs années par échange express du système bioanalyseur Agilent 2100 avec option d'inclure l'offre groupée Agilent pour le PC et l'imprimante.
- Extension de garantie logicielle d'une ou de plusieurs années, comprenant une assistance illimitée, les services gratuits et automatisés de mise à jour des logiciels et d'envoi de bulletins d'information sur l'état des logiciels.

Services d'assistance à l'analyse

Deux services d'assistance sur site relatifs aux kits de dosage sont disponibles :

- Service de mise en route pour familiariser les nouveaux utilisateurs avec le matériel, le logiciel et une application au choix au moment de l'installation du système.
- Service d'exploitation comprenant le diagnostic de problèmes liés à l'application et la formation d'un utilisateur expérimenté sur un kit au choix. Cette formation inclut les analyses d'échantillons du client.

Service d'assistance à la conformité : qualification du système

Pour toutes les offres groupées avec l'instrument bioanalyseur Agilent 2100*, Agilent offre les services complets de qualification de l'installation (QI) et de qualification opérationnelle (QO) du système. Les services QI et QO du bioanalyseur Agilent 2100 sont exclusivement exécutés par des techniciens Agilent spécialement formés et certifiés. La suite complète des services d'assistance comprend la qualification de l'instrument et du logiciel pour différentes configurations.



Bioanalyseur Agilent 2100
Une seule plate-forme... des possibilités infinies pour les analyses d'ARN, ADN, cellules et protéines.

Spécifications de l'instrument

Type	Spécification
Poids	10 kg (22 livres)
Dimensions (hauteur × largeur × profondeur)	290 × 162 × 412 mm (11,4 × 6,4 × 16,2 pouces)
Tension d'alimentation	100 - 240 VCA
Fréquence	50 - 60 Hz
Consommation électrique	60 VA
Température ambiante d'utilisation	5 - 40 °C, (41 - 104 °F)
Normes de sécurité CEI, EN, CSA, UL	Installation de catégorie II, degré de pollution 2, laser de classe 1

*Non disponible pour les instruments de la série "A" vendus avant 2001.

7.9. Annexe I - Composition du milieu LPGA pour les bactéries *X. arboricola*



Composition des milieux usuels :

Milieu II		Eau Peptonée Nitratée pH 7,2	
Bacto Casamino Acid	10g	Bacto Peptone	10g
K ₂ HPO ₄	1g	NaCL	5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1g	Eau distillée	1000ml
Saccharose	10g	Milieu Kelman	
Gélatine	30g	Bacto Peptone	10g
Agar	15g	D(+) Glucose	5g
Eau distillée	1000ml	Agar	17g
Milieu H3		Eau distillée	1000ml
Protéase peptone n°3	20g	Tetrazolium red (après autoclavage)	50mg
Glucose	10g	Milieu LPGA pH 7,2	
K ₂ HPO ₄	1,5g	L: Extrait de levure	7g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5g	P: Bacto Peptone	7g
Eau distillée	1000ml	G: Glucose	7g
Milieu B king		A: Agar	15g
Protéase peptone n°3	20g	Eau distillée	1000ml
Agar	15g	Milieu YEM	
Glycérol	10ml ou 12,6g	Mannitol	10g
K ₂ HPO ₄	1,5g	K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5g	Glutamate de Na	0,5g
Eau distillée	1000ml	Extrait de levure	1g
BCYE simplifié: ajuster le pH à 6,9 avant d'ajouter le Gelzan		NaCl	0,05g
Extrait de levure	10g	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1g
ACES	10g	CaCl ₂	0,04g
Charbon actif	2g	FeCl ₃	0,004g
Gelzan CM	15g	Agar	15g
Eau distillée	1000ml	Eau distillée	1000ml

7.10. Annexe J - Protocole de mise en culture des souches de X.

arboricola



Cirm | CFBP - Bactéries associées aux plantes / CFBP - Plant associated bacteria

Ce dépliant a pour but de vous aider à réaliser la mise en culture de souches lyophilisées que vous venez de recevoir de la CFBP.

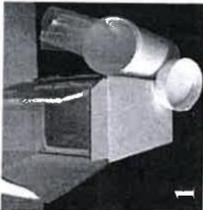
Vous avez reçu de la CFBP

Un colis (emballage agréé 6.2) (1) composé :

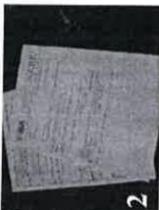
- des autorisations réglementaires liées aux bactéries envoyées (2)
- de la liste des bactéries commandées (2)
- des ampoules de bactéries commandées, identifiées par leur numéro CFBP (3)

Le matériel nécessaire est le suivant :

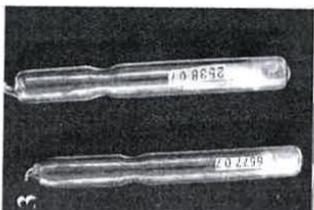
- Bec bunsen ou hotte à flux laminaire
- Un outil pour ouvrir l'ampoule : stylo à pointe diamant ou lime ou disque de carborundum
- Une pipette Pasteur
- Une oëse ou une pipette Pasteur boutonnée
- Eau peptonée nitrifiée en tube
- Gélose nutritive (composition page 4) préconisée pour chaque espèce dans le courrier CFBP (2).



1



2



3

Une vidéo de démonstration est aussi disponible à l'adresse suivante : <http://www.angers.inra.fr/cfbp/culture.html>

Mise en culture des souches lyophilisées :

- En condition d'asepsié, faire 3 traits sur l'étranglement de l'ampoule avec l'outil choisi. Désinfecter à l'alcool, sécher à la flamme. Casser l'ampoule.
- Remettre le lyophilisat en suspension dans 300 µl de bouillon nutritif. (LFG)
- Bien homogénéiser avec l'étiquette qui peut retenir le lyophilisat
- Déposer deux gouttes du lyophilisat (inoculum concentré) sur la gélose nutritive préconisée (2) et mettre le reste dans le tube de bouillon.
- Conserver une goutte intacte et étaler la seconde en 3 secteurs afin d'obtenir des colonies isolées.
- Mettre à l'étuve les boîtes et les tubes à la température optimale de croissance de la souche.
- En cas d'absence de croissance sur le milieu gélosé, il est possible d'étaler une goutte du bouillon sur un nouveau milieu gélosé.



7.11. Annexe K - Article publié

Lab on a Chip

PAPER

View Article Online
View Journal | View IssueCite this: *Lab Chip*, 2022, 22, 2753

Proof of concept of a two-stage GMR sensor-based lab-on-a-chip for early diagnostic tests†

Maïkane Deroo,^{‡,ab} Manon Giraud,^{ab} François-Damien Delapierre,^a Pierre Bonville,^a Mathieu Jeckelmann,^a Aurélie Solignac,^a Elodie Fabre-Paul,^a Mathieu Thévenin,^{‡,a} Frédéric Coneggo,^a Claude Fermon,^a Florent Malloggi,^{‡,c} Stéphanie Simon,^b Cécile Féraudet-Tarisse^{‡,b} and Guénaëlle Jasmin-Lebras^{‡,a}

The development of rapid, sensitive, portable and inexpensive early diagnostic techniques is a real challenge in the fields of health, defense and in the environment. The current global pandemic has also shown the need for such tests. The World Health Organization has defined ASSURED criteria (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable to end-users) that field diagnostic tests must fulfill, which proves the real need in terms of public health. Giant magnetoresistance (GMR) sensors, which have flourished in a wide variety of spintronic applications (automobile industry, Information Technology, etc.), also have real potential in the field of health, particularly for the development of early diagnostic point-of-care devices. This work presents a new type of innovative biochip, consisting of GMR sensors arranged on both sides of a microfluidic channel which allow on the one hand to count magnetic objects one by one but also to better distinguish false positives (aggregates of beads, etc.) from labelled biological targets of interest by determining their magnetic moment. We present the operating principle of this new tool and its great potential as a versatile diagnostic test.

Received 15th April 2022,
Accepted 15th June 2022

DOI: 10.1039/d2lc00353h

rsc.li/loc

Introduction

Early diagnostic devices used routinely in biology laboratories or in the field such as strip tests have the advantage of being fast, easy to use and portable. However, they are often not adapted to large objects such as cells or some bacteria, and they lack sensitivity.¹ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) or PCR (polymerase chain reaction) tests are much more sensitive, but the reaction time is longer and they require trained personnel. In hospitals, the detection of biological objects one by one is often performed by flow cytometry, but once again the equipment is quite large and expensive and it is necessary to train staff in its complex use. The development of microtechnology over the last few decades has led to the creation of all kinds of high-

performance lab-on-a-chips. Optical detection, which in the past required bulky equipment, has become much smaller. However, it remains unsuitable for the study of opaque matrices. Another alternative is electrochemical or static magnetic detection.² These methods have the disadvantage of having too many non-specific interactions, which reduce the quality of the test. Dynamic magnetic methods³ have undergone strong development following the availability of a lab-on-a-chip based on giant magnetoresistance (GMR) sensors. The biological objects (cells, bacteria, etc.), which are naturally non-magnetic, are labelled with magnetic beads⁴ functionalised with monoclonal antibodies directed against the biological target of interest. The superparamagnetic beads are magnetised with a permanent magnet included in the device.

The dynamic detection of the dipolar field induced by this magnetisation is performed by the giant magnetoresistance sensors, which produce a specific signal for each magnetic object. The great strength of this technique⁵ is the detection of biological targets (cells and bacteria) one by one.⁶ However, in order to label the biological objects correctly, it is necessary to introduce an excess of magnetic beads. In the mixture, there are therefore three types of magnetic objects, the labelled biological targets, the individual supernumerary beads and the possible bead aggregates. Most labelled biological objects have a much larger magnetic signal than

^a Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Service de Physique de l'Etat Condensé (SPEC), 91191 Gif-sur-Yvette, France. E-mail: guenaëlle.jasmin-lebras@cea.fr

^b Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Medicines and Healthcare Technologies Department (DMTS), SPI, 91191 Gif-sur-Yvette, France

^c Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie (NIMBE), 91191 Gif-sur-Yvette, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2lc00353h>

‡ These authors contributed equally to this work.

either the single beads or the aggregates. However, the dipole field detected by the GMR sensor is inversely proportional to the cube of the distance between the magnetic object and the sensor. Hence, an aggregate or bead flowing at the bottom of the channel, close to the GMR sensor, produces a signal equivalent to a biological object magnetically labelled by several beads but flowing higher in the channel. One of the critical points is to discriminate the specific signals coming from the magnetically labelled targets of interest from the false positive signals coming from the magnetic bead aggregates.

The first prototype of a GMR sensor-based lab-on-a-chip, containing a single set of sensors below the microfluidic channel, was made by Giraud *et al.*⁷ and tested on a biological model of murine myeloma cells (NS1) immunocaptured by commercial magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) 1 μm in diameter.

In this first prototype, the sensor, located underneath the channel, was positioned a few microns below the microfluidic channel to avoid the detection of weak signals coming from single beads or small aggregates. The performances of this device were evaluated (sensitivity, specificity and repeatability). A sensitivity of 3×10^4 NS1 per mL was obtained. This detection limit was almost equivalent to that of the ELISA tests performed with the same reagents (NS1 cells, mAbs, buffer...), while the GMR technique had the advantage of requiring fewer technical steps. Indeed, the GMR test was performed in 2.5 h (2 h of labelling and 30 min per mL of sample for the test) without any washing steps, while the compared ELISA test (performed in 4 h) required several washing steps. The device sensitivity, although similar to that of ELISA, was reduced by the increased distance between the channel and the sensors. Indeed, this method had the drawback of strongly decreasing the dipolar field, and hence the signal intensity, due to the spacer height. Moreover, it did not allow discrimination of the nature of the objects which circulate in the channel. The sensitivity was thus determined by the difference in number of signals detected between the positive specific sample and the negative controls.

To circumvent these problems, we present a new device with GMR sensors on both sides of the microfluidic channel. This configuration allows simultaneous detection of the different magnetic objects circulating in the channel (targeted biological objects, single magnetic beads and bead aggregates) by both sensors. For the first time, thanks to this technique of detection, it is possible to know the height, the magnetic moment and therefore the number of beads that the detected objects contain. It is then possible to differentiate the biological objects magnetically labelled by many beads in the specific samples from the bead aggregates that account for the false positives and to plot the number of magnetic objects detected simultaneously by both sensors as a function of the number of beads they contain.

This opens very interesting prospects for increasing both the specificity and the sensitivity. We will first describe the

fabrication of this two-sensor biochip as well as the principle of detection, then we will present in the second part the proof of concept of this new technique, with a double GMR detection within the same biochip, to discriminate signals generated by non-specific magnetic objects from magnetically labelled biological targets of interest.

Materials and methods

Principle of GMR detection

The principle of GMR sensors is based on one of the principles of spintronics:⁸ an electron has a charge but also a magnetic moment which, if manipulated, can influence electrical transport. GMR sensors have a so-called “spin valve”⁹ configuration. They consist of two completely decoupled ferromagnetic metal layers, separated by a conductive and non-magnetic layer (copper layer) (Fig. 1A).¹⁰ The first layer, called the hard layer, has its magnetisation pinned (by exchange interaction with an antiferromagnetic layer) in a fixed direction over a wide range of applied magnetic fields, while the other layer, called free layer, has a magnetisation that rotates easily under the effect of a magnetic field. The non-magnetic layer will allow good decoupling between the two ferromagnetic layers so that the reversal of the free layer does not affect the pinned layer.

GMR stack fabrication

The GMR stacks¹¹ (Fig. 1B) were deposited by sputtering and patterned by standard UV lithography as described in Giraud *et al.*⁷ on silicon and sapphire wafers (as will be explained later for the double detection, a transparent cover is needed to align the two substrates).

In order to maximise the sensitivity of the sensor at low fields, the magnetisation of the hard layer is pinned perpendicular to the easy magnetisation axis of the free layer, *i.e.*, along the sensitive axis of the GMR sensor which is taken as the y direction (Fig. 1C). Annealing under 1 T at 200 °C for 10 min orients the reference layer (pinned layer), *i.e.*, sets the exchange bias direction between IrMn and CoFe.¹² Thus, the magnetoresistance, which is proportional to the cosine of the angle between the magnetisations of the two magnetic layers, varies linearly with small magnetic field variations between -2 mT and 2 mT.

The GMR sensors have the yoke geometry^{13,14} ($4 \times 120 \mu\text{m}^2$) as also detailed in Giraud *et al.*⁷ (Fig. 1C).

Finally, a 240 nm passivation layer consisting of 140 nm Al_2O_3 and 100 nm SiO_2 is sputtered on the sensors, except on the contact pads, to avoid oxidation. The resistance of the sensors is typically between 500 and 600 ohms.

The lab-on-a-chip consists of two series of sensors arranged face to face on either side of the microfluidic channel. During annealing (allowing the reference layer to be oriented), the two wafers are oriented head to toe as they will be bonded on either side of the channel later. This allows the hard layers of both wafers to be in the same direction and minimises a possible slight orientation error of the reference layer.

Lab on a Chip

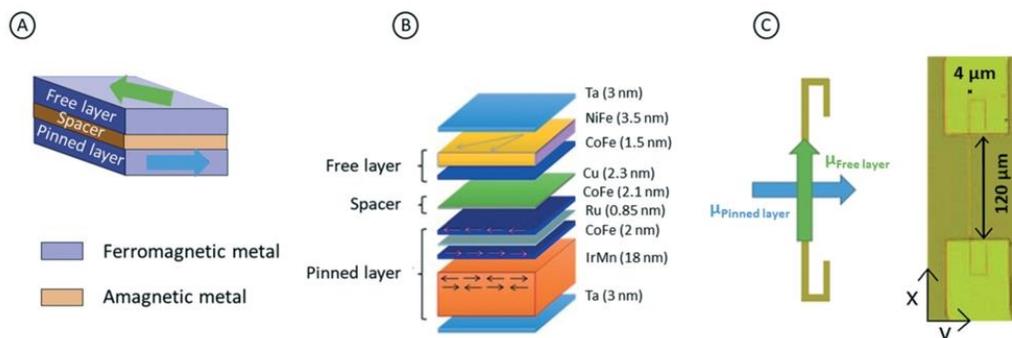


Fig. 1 – A: Scheme of the main components of a GMR stack. Free and pinned layers are ferromagnetic and their magnetisation is represented by arrows. The spacer is a diamagnetic conductor. B: GMR stack. C: Scheme and photograph of a processed GMR sensor in yoke shape. The sensor measures 120 μm along the x axis and 4 μm along the y axis.

Biochip fabrication

The new biochip has GMR sensors below and above the microfluidic channel. In order to obtain simultaneous detection of biological objects circulating in the channel, it is necessary to precisely align the two sets of sensors. The bottom sensors can be placed on any substrates and here have been deposited on the Si wafer. In contrast, the upper sensors must have a transparent substrate to allow the perfect alignment but also the UV reticulation of the glue.

The first tests were done on a glass substrate, but the different mechanical stresses exerted during the fabrication led to micro cracks that damaged the sensors. For that

reason, they were deposited on a sapphire substrate which has a better mechanical resistance. One of the most delicate operations in microfluidics is closure of the biochip hermetically without obstructing it. We propose an innovative technology which consists in drawing only the skeleton of the channel on the surface of the silicon substrate by photolithography, thus limiting the issue of flatness and cleanliness to a small area.

Before starting the assembly of the biochip, the top substrate was perforated using a laser (EXCIMER) at the location of the future channel reservoirs for the fluidic connections (Fig. 2A).

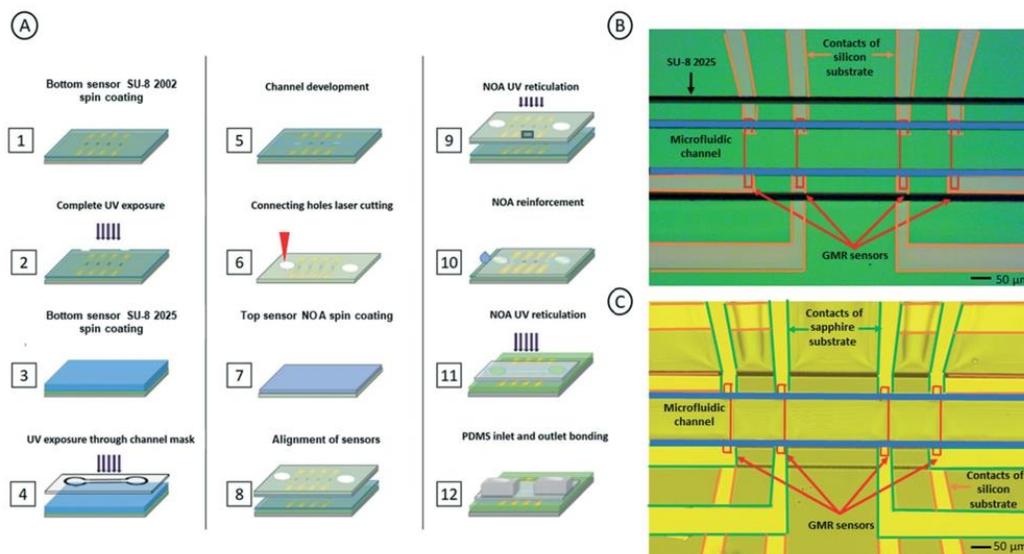


Fig. 2 – A: Biochip fabrication. B: Microfluidic channel in SU-8 2025 on the silicon substrate before assembly of the biochip. C: Microfluidic channel after assembly of the biochip.

On the bottom substrate, a thin adhesion layer of photoresist SU-82002 (MicroChem®) with a thickness of approximately 2 μm is spin coated on the passivation layer of the sensors underneath after an O_2 plasma treatment (30 s, 200 W, 0.2 mbar) to improve the adhesion. The electrical contacts of the sensors are protected by tape during this step. The device is then baked and exposed for 40 s with an MJB3 aligner (Karl Süss, 5 mW cm^{-2} , 405 nm) followed by a post-exposure bake. The thickness of the adhesion layer is then measured with a mechanical profilometer (Alpha-Step, KLA Tencor).

With the aim of manufacturing the skeleton of the channel on the adhesion layer, the photoresist SU-8 2025 (MicroChem®) is spin coated on the adhesion layer (Fig. 2B). Spin coating parameters depend on the desired channel height. Typically, for a channel height between 20 and 25 μm (needed for the study of eukaryotic cells) the parameters are the following: 5 s–500 rpm–300 rpm s^{-1} , 30 s–3500 rpm–300 rpm s^{-1} , 5 s–6000 rpm–1000 rpm s^{-1} . After baking at 65 $^\circ\text{C}$ for 1 min followed by a temperature ramp of 2.5 $^\circ\text{C min}^{-1}$ up to 95 $^\circ\text{C}$ to have a homogeneous deposit on the whole surface, the design of the walls of the channel is exposed by UV-photolithography for 28 s using a chromium mask well centred with the sensors underneath. After a post-exposure bake, the SU-8 2025 is developed in SU-8 developer (MicroChem®) for 4 min and then rinsed in isopropanol and water.^{15,16} The height and width of the gap between the channel walls are measured with the profilometer. Finally, the patterns are baked for 10 min at 110 $^\circ\text{C}$ to be hardened and resistant to solvents. The following step, the most delicate one, consists in sealing the biochip by gluing both substrates. The photosensitive glue Norland Optical Adhesive 81 (NOA81) is spin coated (80 s–5500 rpm–300 rpm s^{-1} , 3 s–8000 rpm–1000 rpm s^{-1}) on the upper substrate after an O_2 plasma treatment (30 s, 200 W, 0.2 mbar). The electrical contacts of the sensors are protected by tape during this step. Typically, a 5 μm thick layer of NOA81 is spin coated with these parameters.

The two sets of sensors at the top and the bottom are aligned using MJB3 aligner and the cover substrate is put in contact with the skeleton of the channel (Fig. 2C). The NOA glue slowly diffuses along the walls of the channel. In case of a problem during this step, NOA can easily be removed by a 1 min bath in acetone. When it has covered the entire skeleton, a 300 s exposure with MJB3 aligner is performed to solidify the glue. To enable reticulation of NOA glue masked under opaque contacts of the top substrate, an exposure of 2 min on each side of the device using a flexible UV optical fibre was performed. Finally, additional NOA was then diffused by capillarity in the space between the two substrates and exposed for 500 s with MJB3 aligner to achieve sealing.

Concerning the inputs and outputs of the microfluidic channel,^{17–19} a thick layer of liquid PDMS was spin coated on a substrate, and then we cut out some PDMS blocks already punched and dipped them in liquid PDMS. They were placed

at the level of the inlet and outlet holes of the microfluidic channel. Then the biochip was put in the oven at 80 $^\circ\text{C}$ for about 2 hours.

Preparation of the samples and experimental protocol

To detect biological objects, which are naturally non-magnetic, it is necessary to label them with magnetic particles (MP or beads) functionalised with monoclonal antibodies specific to the target of interest (Fig. 3A). In order to be able to compare performances obtained with the new lab-on-a-chip with those obtained with the previous one,⁷ the experiments were performed with the same biological model, NS1 murine myeloma cells. However, this biochip is versatile *per se* in its use. Indeed, its cellular target specificity relies on the use of antibodies (coupled onto the surface of MyOne Dynabeads) specifically directed against the cellular target of interest, whatever it is.

Each MP has several identical superparamagnetic nanocores embedded in it,^{20,21} and measurement of their magnetisation (Fig. S1†) shows that it obeys a Langevin law. On average, the saturated magnetic moment of a bead is 2.1×10^{-14} A m^2 for a magnetic field of 700 mT and 1.56×10^{-14} A m^2 at 90 mT.

Considering that a NS1 cell has an average diameter of 6 μm , the steric occupancy calculation shows that, theoretically, one can be labelled with about 150 beads of 1 μm diameter. In order to optimise cell labelling, it is necessary for the beads to be supernumerary.

Dynabeads MyOne Streptavidin T1 are coupled to biotinylated antibodies according to a commercial protocol. For biotinylation of anti-CD138 antibodies, 100 μg of antibodies are diluted in 400 μL of 0.1 M borate buffer pH 9.0. Then, 6 μL of biotin in DMF at 1 mg per mL is added to the antibody solution (coupling ratio = 20 molecules of biotin per molecule of antibody) and the mixture is incubated for 30 min at room temperature. The reaction is then stopped by the addition of 100 μL of tris(2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) buffer 1 M pH 8.0 for a further 15 min incubation at room temperature to inactivate unreacted biotin. The biotinylated antibody is separated from the free biotin by passage through a Zeba Desalt Spin column (Thermo Scientific) in potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 with sodium chloride 0.15 M. The final concentration is determined spectroscopically at 280 nm using the Beer-Lambert law. Finally, according to the commercial protocol, after three washes of 1 mg of beads in PBS, 20 μg of biotinylated antibodies were added and the reaction mixture was incubated under agitation at room temperature for 30 min. Then, functionalised beads were washed four times in PBS containing 0.1% BSA and an external magnet was used to remove uncoupled biotinylated antibodies.

For the specific sample, NS1 cells are diluted to the desired concentration in 1 mL of culture medium (semi-complex matrix containing 15% fetal calf serum, quite close to reality of diagnostic purposes). The magnetic beads are

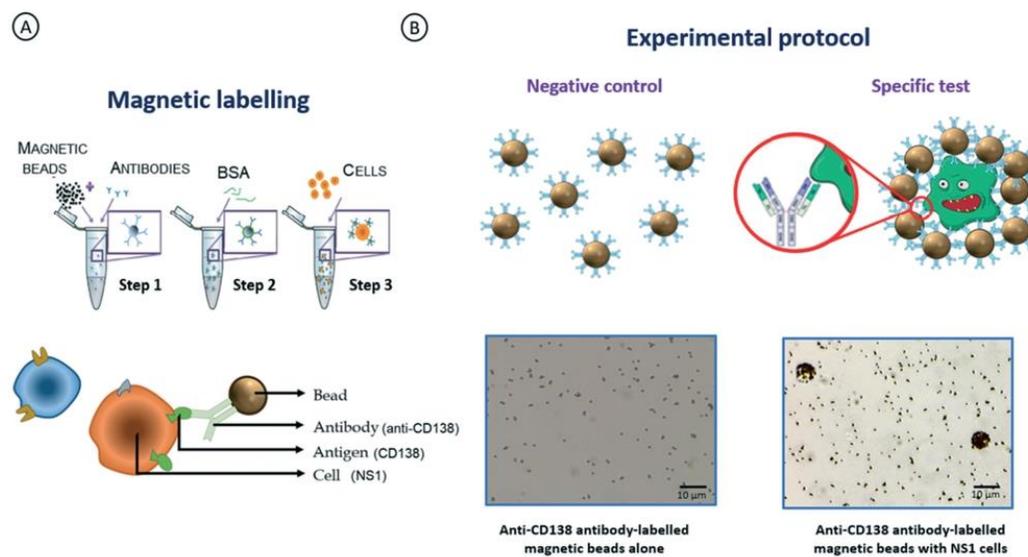


Fig. 3 – A: Cell labelling with 1 μm -magnetic Dynabeads MyOne. Step 1: Coupling of Dynabeads MyOne Streptavidin T1 with biotinylated antibodies as described by Giraud *et al.* Step 2: Saturation and storage of functionalised beads in PBS 0.1% BSA. Step 3: Magnetic labelling of cells with functionalised beads. B: Experimental protocol performed with a negative control (left) composed of anti-CD138 antibody-labelled beads alone and a specific test (right) with magnetic beads functionalised with anti-CD138 antibodies in the presence of NS1 target cells.

then vortexed for 2 min and added to NS1 cell samples to reach a final concentration of 1.5×10^7 beads per mL. The mixture is incubated under gentle rotation at 20 °C for 2 h.

The NS1 culture medium is composed of RPMI-1640 solution (Sigma-Aldrich®) containing 15% decomplemented fetal calf serum (Gibco®), 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich®), 1% non-essential amino acid solution (Sigma-Aldrich®), 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich®) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich®).

Two samples were prepared: a specific sample containing 7×10^3 NS1 per mL in the presence of 1.5×10^7 per mL magnetic beads functionalised with the anti-CD138 antibody and a negative sample containing only 1.5×10^7 per mL beads functionalised with the same specific anti-CD138 antibody (Fig. 3B).

For each experiment, a visual verification of the samples is performed with an optical microscope, magnification 40. The labelling of NS1 cells with magnetic beads functionalised with the specific antibody could thus be controlled.

A statistical study was carried out on dozens of pictures taken under the microscope and it was shown, using ImageJ and Paintshop pro software, that the cells were labelled on average with 50 beads, with a distribution between 20 and 80 beads. 7% were not labelled. 98% of NS1 were labelled with more than 7 beads.

It can also be seen on the picture of the specific sample in Fig. 3B that for the used concentration of 7×10^3 NS1 per mL, cells do not form clusters between them. In Fig. S2,† pictures of different concentrations of NS1 have been added.

It can be seen that cell clusters appear from 10^4 NS1 per mL and are very numerous from 10^5 NS1 per mL. As our device is designed for early diagnostic purposes, samples with only low concentration of the biological target (*i.e.*, below 10^4 NS1 per mL) are in our dynamic range focus. This GMR sensor-based biochip is not suitable for high concentrations of cells. Indeed, on the one hand, clogging problems may occur in microfluidic channels and on the other hand, dynamic one-to-one counting becomes difficult, as cells could flow together in clusters causing data resolution difficulties.

Experimental set-up

The experiment consists of simultaneous dynamic detection of the superparamagnetic objects flowing in the microfluidic channel (biological objects labelled with MPs, single MP or aggregates of MPs) by two sets of sensors placed face to face at the bottom and the top of the channel, giving rise for each sensor to a characteristic antisymmetric signal (Fig. 4A). The biochip is fixed on the sample holder which is inserted into the 90 mT field of a homogeneous²² permanent magnet oriented along Oz perpendicular to the sensor layers located in the (xy) plane and allows the magnetic beads to be polarised. This field strength allows the superparamagnetic beads to be correctly magnetised to a value close to their saturation moment without affecting the magnetisation of the sensor layers. The sample, stored in a closed reservoir outside the magnet, connected to the inlet of the channel, is injected into the lab-on-a-chip using

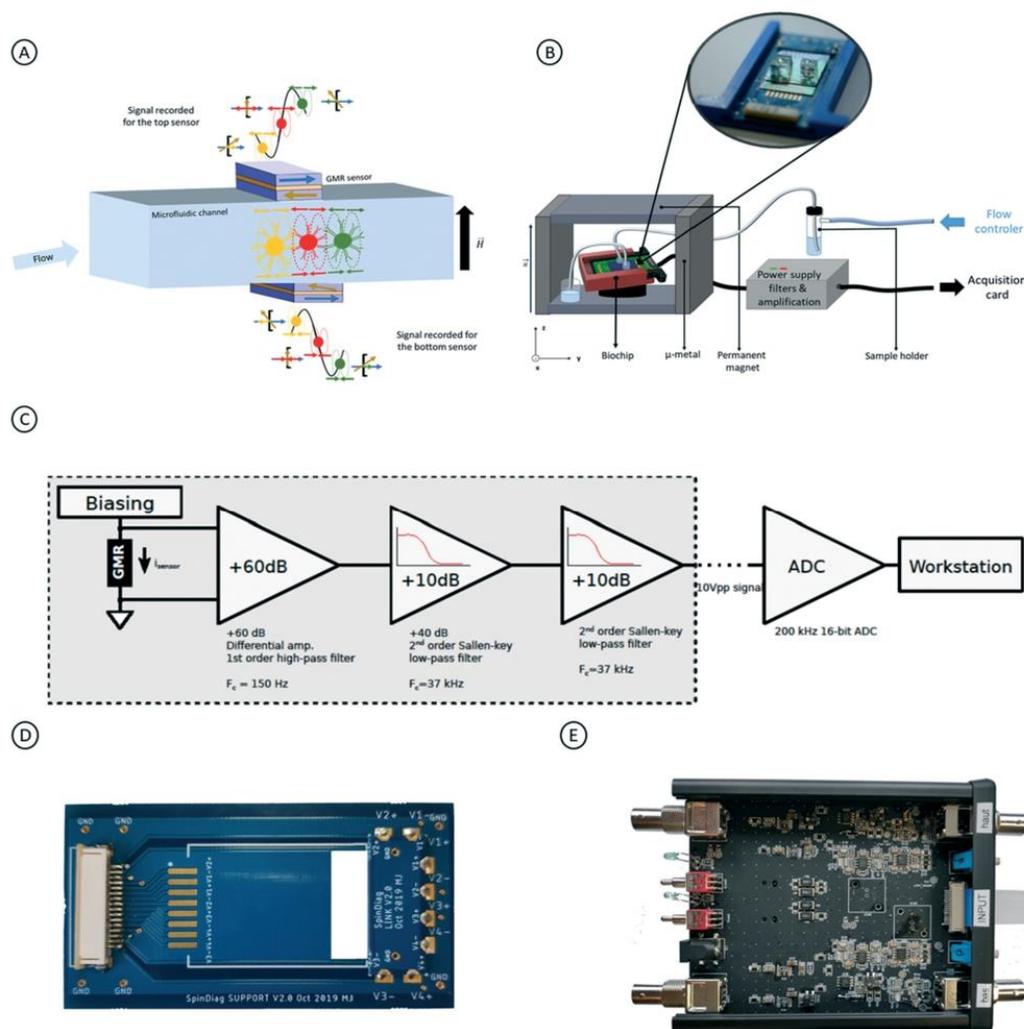


Fig. 4 A: Scheme of the detection of a magnetic object passing through the microfluidic channel. B: Complete set-up composed of a permanent magnet in which the biochip is inserted, a sample holder connected to a pressure regulator and an electronic box. C: Schematic view of the whole acquisition front-end, the dashed box corresponds to the acquisition front-end PCBs. The GMR sensor is attached to the separated PCB illustrated by figure D. The interconnection is ensured by a flexible flat cable. D: Designed PCB. E: Photograph of the system in a metallic case (normally closed), the flexible flat cable connects to the left input.

a Fluigent® pressure controller whose pressure is set at 345 mbar (Fig. 4B). The flow velocity of the object in the microfluidic channel (between 10 and 30 cm s^{-1}) is determined for each experiment by means of the analysis program, which allows adjustment of the flow velocity of the experimental signals obtained according to the simulated signals. This possibility to adjust this parameter is essential for future studies of biological objects in different complex matrices that may be more viscous than the culture medium (blood, plasma, etc.).

Electronics

Since two sensors are used on each side of the microfluidic channel, a two-channel acquisition front-end was designed and developed. Basically, the GMR sensors act as a resistance whose value varies with the magnetic field. Consequently, the acquisition of the signal from a GMR sensor reduces the measurement of the variation of the current flowing through it over time. Thus, the electrical potential difference across the GMR sensor can be measured provided that the sensor is

correctly biased. The biasing of the sensors is performed by a balanced Wheatstone bridge²³ regulated by a LT3045 voltage regulator. Additionally, a stitching method²⁴ was employed on the whole printed circuit board (PCB) to ensure low-level noise.

When 1 mA flows through the sensor, a 2×10^4 V to 8×10^{-4} V variation of the potential difference across the GMR sensor can be observed. Therefore, since the digitiser has an input voltage range of 10 V, a gain of 80 dB (10 000 V/V) is required. This is achieved by a first 60 dB gain stage made of a low-noise (1.12 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ for 60 dB gain) AD8421 (Texas Instruments) differential amplifier with a gain of 60 dB (500 V/V). It also provides a good common mode rejection ratio (80 dB) and implements a first-order high-pass filter $F_c = 150$ Hz. A second stage that comprises two active Sallen-key low-pass filters (10 dB each) made of AD8676 (Analog Devices) precision operational amplifiers is implemented to obtain the 20 dB gain required to achieve a global gain of 8600 V/V. The whole system (Fig. 4C) forms an active 150 Hz–37 kHz band-pass filter to specifically select the frequency range corresponding to the displacing cells.

The GMR sensor is attached to a specifically designed PCB used as an interposer (Fig. 4D), connected to the acquisition front-end by a flexible flat cable (Fig. 4E).

To ensure a minimal noise level, two lithium-ion batteries power the whole system, which ensures more than 48 hours of continuous measurements.

Calibration of sensor sensitivity and noise

In order to measure the response of the sensor in a variable magnetic field, the sensitivity (S) of the GMR sensors is initially determined outside the set-up. The sensors are

powered by a current of 1 mA supplied by a Keithley current source (Series 6221) and inserted in an external magnetic field of ± 10 mT along the y axis, generated by two five-centimetre diameter Helmholtz coils fed by a commercial current generator (Kepco). The output voltage is filtered at 30 Hz and twice amplified by a commercial low-pass preamplifier (SR560, Stanford Research Systems). The variation of the magnetoresistance and the sensitivity are defined as a function of the resistance R_P (where the magnetisations of the reference and the free layer are parallel) and R_{AP} (anti-parallel state) (Fig. 5A).^{25–27} The sensitivity curve in Fig. 5B allows calculation of the percentage of magnetoresistance of the sensor (% MR) and its sensitivity S using eqn (1) and (2), respectively:

$$\% \text{ MR} = \frac{R_{AP} - R_P}{R_0} \quad \text{with } R_0 = \frac{R_{AP} + R_P}{2} \quad (1)$$

$$S = \frac{\Delta R \times 100}{\Delta H \times R_0} \quad (2)$$

The sensitivity curve also checks the linearity of the sensor and detects the presence of a hysteresis cycle or a field offset. This gives us two sensor sensitivities, one for the top sensor and one for the bottom sensor.

When the biochip is placed on its holder in the permanent magnet of the set-up, it is necessary to recalibrate the sensitivity before the start of the experiment to reach identical sensitivity on both sensors. Indeed, having the same sensitivity on both sensors will facilitate the analysis of the signals they emit each time they detect a magnetic object simultaneously. These signals emitted for the same magnetic

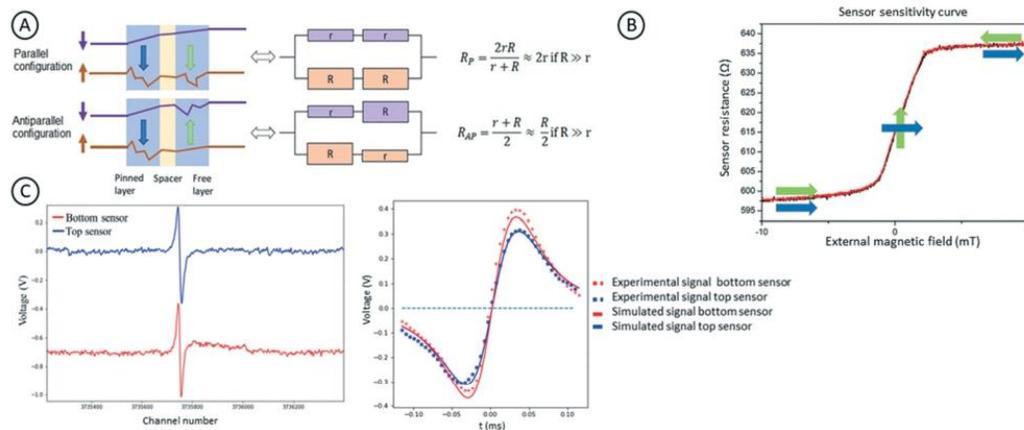


Fig. 5 – A: Principle of GMR measurement. B: Experimental sensitivity curve with a schematic representation of the relative orientations of the two ferromagnetic layers. C: Graphs representing a coincidence. On the left, the top and bottom sensors taken separately, which simultaneously emit a signal when a magnetic object passes through the microfluidic channel. On the right, a coincidence where the solid lines represent what we are supposed to obtain during simulations and the dotted lines represent what we actually obtain during the passage of our biological objects with a flow velocity of 30 cm s^{-1} .

object by the top and bottom sensors are called “coincidences” in the following article (Fig. 5C).

The sensors are powered by a 1 V voltage V_0 with an electronic box described in the “electronics” section. Sensitivity calibration is performed using Helmholtz coils, positioned on both sides of the permanent magnet, and powered by a sinusoidal current (100 mA–1000 Hz), which generates an AC magnetic field H of 0.184 G (field calibration using a measuring coil) parallel to the layers of the sensors.

With the help of three micrometric screws placed on this sample holder, the position (x, y, z) of the biochip is determined in order to obtain the optimum output peak-to-peak amplitude voltage V_{pp} corresponding to the highest possible but identical sensitivity, given by eqn (3), on both sensors placed face to face.

$$S = \frac{V_{pp} \times 100}{H \times V_0 \times G} \quad (3)$$

where $G = 8600$ is the amplification gain.

Before injecting the sample, a 20 second blank is recorded to determine the experimental noise. It is typically 40 mV peak-to-peak at the output after an amplification of 8600 (4.6 μ V referred to input noise).

The limit of detection (LOD) of the signals is defined as the field H inducing a signal-to-noise ratio (SNR) of 1. For a sensitivity S of 0.78 % mT^{-1} and a noise of 40 mV peak-to-peak voltage, the LOD is estimated to be 290 nT.

Theory

The superparamagnetic beads are polarised along Oz by a homogeneous permanent field of 90 mT oriented perpendicular to the sensor layers located in the (xy) plane and acquire an induced magnetic moment μ parallel to Oz.

The individual magnetic moment μ of one magnetic bead is extracted from the magnetisation *versus* field curves at 300 K, made with a vibrating sample magnetometer (Fig. S1†). The dipolar field produced at a point C by the magnetic moment μ located at a point B is given by the following equation:

$$\vec{H}_{\text{dip}} = 3\vec{BC} \times \frac{\vec{BC} \cdot \vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^5} - \frac{\vec{\mu}}{\|\vec{BC}\|^3} \quad (4)$$

The sensor cannot be considered as a point object. Thus, the dipole field generated by a bead of moment μ located at the point (x_B, y_B, z_B) is detected by the whole sensor. The sensitivity axis Oy of the sensor is collinear with the velocity vector of the beads circulating in the microfluidic channel. The geometry used for the sensor, in the shape of a yoke, makes it insensitive to field variations along the x - or z -axis, so that only the component H_y of the dipole field is relevant. This component must be integrated over the entire surface of the sensor. The H_y generated on a sensor was calculated for a bead of coordinates (x_B, y_B, z_B) and is given by eqn (5).²⁸ This

signal has a characteristic antisymmetric shape which allows it to be distinguished from the background.

$$H_y = \frac{\mu}{l \times L} \left(\left(\frac{y_l}{q_2^2} \left(\frac{x_r}{r_2} - \frac{x_l}{r_1} \right) + \frac{y_r}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_4} - \frac{x_r}{r_3} \right) \right) \sin \theta \sin \psi \right. \\ \left. + \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_3} - \frac{1}{r_4} \right) \sin \theta \cos \psi \right. \\ \left. + \left(\frac{h_{\text{TOP}}}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) + \frac{h_{\text{TOP}}}{q_4^2} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \cos \theta \right) \quad (5)$$

where

$$x_r = \frac{L}{2} - x_B$$

$$x_l = -\frac{L}{2} - x_B$$

$$y_r = \frac{L}{2} - y_B$$

$$y_l = -\frac{L}{2} - y_B$$

$$h_{\text{TOP}} = z_B + Z_{\text{spacer bottom}}$$

$$r_1 = \sqrt{x_l^2 + y_l^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

$$r_2 = \sqrt{x_r^2 + y_l^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

$$r_3 = \sqrt{x_r^2 + y_r^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

$$r_4 = \sqrt{x_l^2 + y_r^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

$$q_2 = \sqrt{y_l^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

$$q_4 = \sqrt{y_r^2 + h_{\text{TOP}}^2}$$

The two angles θ and φ are the polar and azimuthal angles of the moment μ . The origin O of the reference frame is taken at the centre of the sensor of length L in the direction x and width $l \ll L$ in the direction of the sensitive axis y .

This expression is in principle valid for a one-point dipole, but we can use it for the 1 μm diameter Dynabeads because

they contain superparamagnetic nanocores of mean diameter 5–10 nm which can be considered as point dipole moments.

In the present analysis, the two angles θ and φ were set to 0, considering ideal superparamagnetic beads whose magnetic moments align parallel to the magnetic field of 90 mT. The dipolar field H_y then takes the simplified form given by eqn (6):

$$H_y = \frac{\mu}{l \times L} \left(\frac{h_{\text{TOP}}}{q_2^2} \left(\frac{x_l}{r_1} - \frac{x_r}{r_2} \right) + \frac{h_{\text{TOP}}}{q_4^2} \left(\frac{x_r}{r_3} - \frac{x_l}{r_4} \right) \right) \quad (6)$$

Moreover, simulations have shown that the signal produced by an object containing N superparamagnetic

beads, with individual moment μ , randomly distributed on its surface, is the same as that of a point magnetic object whose magnetic moment is $N\mu$. The biological objects were thus considered subsequently as magnetic point objects (Fig. 6A).

Then, coincident top and bottom signals were simulated for 200 different values of flow height in the microfluidic channel using eqn (6). The ratio of the amplitudes of these signals was calculated, so that for each calculated ratio a height flow could be extrapolated. This curve is therefore used as a reference for our experimental signals to determine the magnetic object height flow in the microfluidic channel (Fig. 6B). This calculation was performed under the

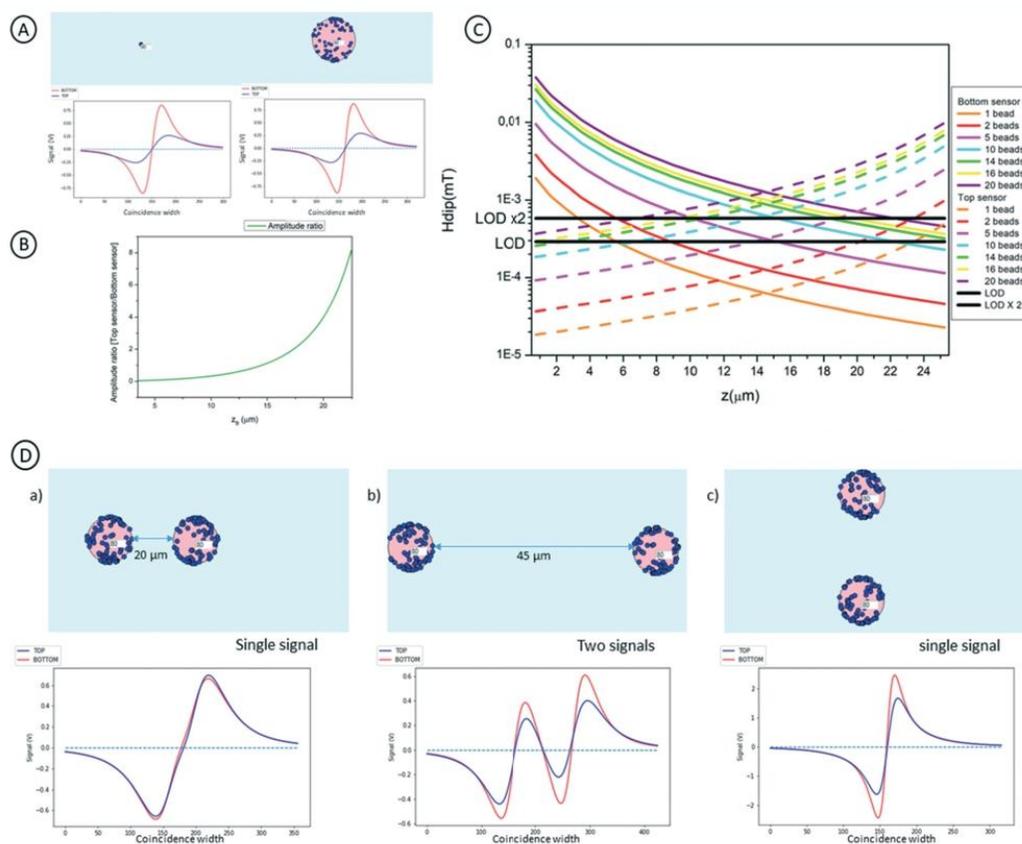


Fig. 6 – A: Simulations performed for the detection of a magnetic core containing 80 beads and a biological object 10 μm in diameter labelled by the same number of magnetic beads on the right. It can be seen that the signals emitted in these two cases are almost identical. This proves that biological objects can be considered as punctual objects. B: Ratio of the maximum amplitude of the TOP sensor signal to the maximum amplitude of the BOTTOM sensor signal at 300 points on the positive part of the simulated signals. Thus, for each calculated ratio, a flow height can be extrapolated. C: Calculation of the dipole field produced simultaneously on the top and bottom sensors by magnetic objects containing different numbers of beads, as a function of their height of passage z in the channel. The detection limit LOD is indicated. This calculation takes into account the thickness of NOA81 (top sensor) and SU-8 2002 (bottom sensor). D: Simulations performed for two cells labelled by 80 magnetic beads in order to show the influence of their position in relation to each other. In Fig. 6D-a and b, the cells flow through the centre of the channel and are separated by a distance of 20 μm and 45 μm respectively. In Fig. 6D-c, the cells flow one above the other.

conditions of our experiments for Dynabeads polarised by a permanent field of 90 mT with an individual magnetic moment of 1.56×10^{-14} A m² and flowing in a 26 μm height channel separated from the top and bottom sensors respectively by 5 μm NOA and 2 μm SU8-2002. The radius of the biological object is also taken into account.

The calculation of the dipole field produced simultaneously on the top and bottom sensors by magnetic objects containing different numbers of beads, as a function of their height of passage z in the channel, is shown in Fig. 6C. The limit of detection of 290 nT is also shown. This calculation takes into account the thickness of NOA81 (top sensor) and SU-8 2002 (bottom sensor). It can be seen that magnetic objects containing at least 5 beads can be detected simultaneously by the top and bottom sensors when they flow through the middle of the channel. On the other hand, magnetic objects must contain at least 16 beads to be detected simultaneously over the whole channel height.

Fig. 4A shows the dynamic detection of a magnetic object with a laminar flow in a channel, polarised by the homogeneous permanent field of 90 mT simultaneously detected by the bottom and top sensors. The component H_y of the dipolar field induces a resistance variation of the sensors giving rise to a characteristic antisymmetric signal.²⁹ In the scheme, if the detection by the bottom sensor is considered, H_y is first in the opposite direction to the magnetisation of the pinned layer of the GMR (anti-parallel state), resulting in an increase of the resistance. Above the centre of the GMR sensors, both H_y components compensate for each other and the signal is vanishingly small. Finally, when the magnetic object overcomes the sensor, the component H_y is in the same direction as the magnetisation of the pinned layer (parallel state), resulting in a decrease of the resistance. As shown before, this simultaneous detection is only available if the dipolar field of the magnetic object corresponds to the criteria of number of beads (magnetic moment) and height in the channel, defined in Fig. 6C. Otherwise, it is only detected by one of the sensors (top or bottom sensor depending on its flow height in the channel) or not at all if it contains fewer than 5 beads. Moreover, as the two substrates (silicon and sapphire) of the biochip are glued face to face, the signals simultaneously induced by the same object on the top and the bottom sensors have opposite symmetrical shapes (Fig. 4A).

The choice of the orientation of the signal for the top and bottom sensors on the scheme is arbitrary.

As we have seen, our lab-on-a-chip allows the dynamic detection of magnetic objects one by one. It is, however, important to know the influence of simultaneous passage of labelled cells in the channel.

In the case of a sample containing a concentration C of biological objects defined by: $C = N_{\text{cells}}/V_{\text{sample}}$ homogeneously distributed in the matrix, the number of labelled $N_{\text{cells}}^{\text{channel}}$ channel flowing together in the channel of volume V_{channel} is defined by: $N_{\text{cells}}^{\text{channel}} = C \times V_{\text{channel}}$.

The concentration C of the sample studied is 7×10^3 NS1 per mL. In the case of our lab-on-a-chip, which has a height of 26 μm, a width of 100 μm and a length of 10^4 μm, $V_{\text{channel}} = 2.6 \times 10^2$ μL. Therefore $N_{\text{cells}}^{\text{channel}} = 0.182$.

This means that in a sample with a uniform distribution of cells, the cells flow one by one through the channel. In reality, even if the sample is shaken to maintain the most homogeneous distribution possible, there is always a possible sedimentation of the cells.

For this reason, 3 simulations of the signals emitted by two cells labelled with 80 beads, located at different positions relative to each other, are shown in Fig. 6D. In Fig. 6D-a and b, the two cells are in the centre of the channel which is a likely hypothesis when looking at Fig. 7. In Fig. 6D-a, the cells are separated by 20 μm. Their signals are confounded. In Fig. 6D-b, the two cells are separated by 45 μm and their signals are perfectly distinct. The signals start to be mixed below a distance of 30 μm. This is a very small distance compared to the length of the canal (10^4 μm). In Fig. 6D-c, two cells flowing one above the other have a unique signal. This configuration is highly unlikely because of the size of the cells relative to the height of the channel.

Results and discussion

In order to highlight the determination of the magnetic moments of objects containing different numbers of beads and in anticipation of future complete studies of biological objects, two samples were studied.

A specific sample of 200 μL, containing a concentration of 7×10^3 of bead-labelled NS1 murine cells per mL, was first injected in the biochip.

The negative control sample of 200 μL containing only superparamagnetic beads (Dynabeads) functionalised by the specific anti-CD138 antibody at the same concentration as in the specific sample was then studied. After the passage of each sample in the channel, the culture medium was introduced in order to recover the few signals of the magnetic objects possibly remaining in the pipes.

The sensitivity and the experimental noise of both sensors integrated in the biochip (Fig. 4B) are determined, as explained in the ‘‘Calibration of sensor sensitivity and noise’’ section, before the flowing of each sample in the channel. The values are shown in Table 1:

Data are acquired using an acquisition card (Data Translation) interfaced by a program in Pascal (under Lazarus). In this project, the acquisition frequency was fixed at 200 kHz. The acquisition frequency must be adapted to the speed of the samples in the channel to have a minimum number of points recorded per signal, guaranteeing a reconstruction without distortion of the peaks. Currently, the flow velocity is generally between 10 and 30 cm s⁻¹ (see ‘‘Experimental set-up’’), which corresponds to a flow frequency of a few kHz.

Once the acquisition is finished, the data are analysed with homemade Python software. The signals of the top and

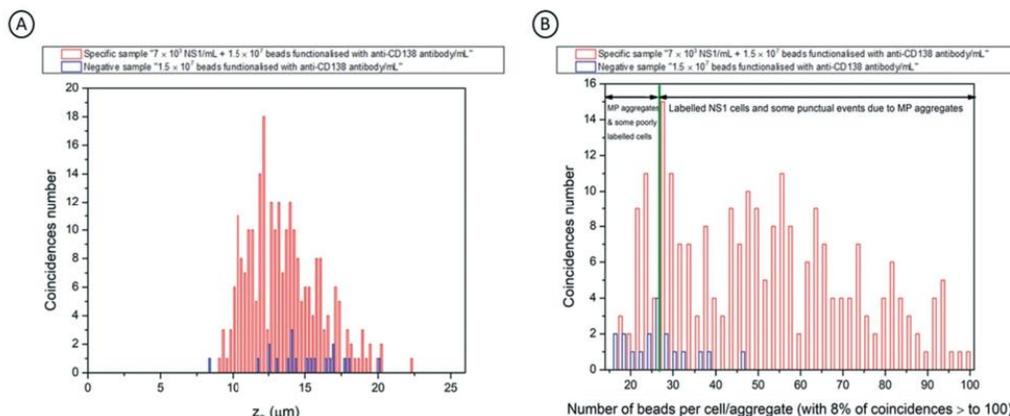


Fig. 7 – A: Comparison of the number of coincidences as a function of their flow height in the microfluidic channel for the specific sample containing Dynabeads MyOne beads functionalised with the anti-CD138 antibody in the presence of 7×10^3 NS1 cells per mL (red) and the negative sample containing only Dynabeads MyOne beads functionalised with the anti-CD138 antibody (blue). B: Comparison of the number of beads per coincidence for the specific sample containing Dynabeads MyOne beads functionalised with the anti-CD138 antibody in the presence of 7×10^3 NS1 cells per mL (red) and the negative sample containing only Dynabeads MyOne beads functionalised with the anti-CD138 antibody (blue).

Table 1 Experimental parameters for specific and negative samples

	Sensitivity (% mT ⁻¹)		Output noise (mV peak-to-peak)		Gain
	Top sensor	Bottom sensor	Top sensor	Bottom sensor	
Specific sample	0.78	0.78	42	45	8600
Negative control	0.78	0.78	61	39	

bottom sensors are treated independently with a different detection threshold in relation to the noise determined for each one at the beginning of the experiment (Table 1). The aim is to count and to analyse all the coincidences (as a reminder, signals produced simultaneously by the top and bottom sensors arranged face to face when a magnetic object flows in the channel) in order to extract the parameters used to identify the nature of the detected magnetic objects (labelled NS1 cells or MP aggregates).

To analyse the signals, a number of criteria must be taken into account, such as the shape, the width and the amplitude of these signals.

As we have seen before, magnetic signals have a characteristic sinusoidal shape, which is used to eliminate noise peaks. By convention in the analysis, a valid peak must necessarily have a negative peak before its positive peak in a certain interval. Simulations presented in Fig. S3† have shown that the interval between these two peaks, when it is a magnetic signal, depends on the flow velocity and its flow height. The signals emitted in the opposite direction by the top or bottom sensors glued face to face (Fig. 4A) are inverted by the program in order to have coincidences formed by signals of identical shape and sign.

Once the signals meet the criteria defined above, a separate but identical amplitude analysis is performed for

both sensors. For each sensor, the signals whose amplitude V_{op} is greater than or equal to twice the noise are selected.

To give a valid coincidence, the signals detected by both top and bottom sensors must have respective centres separated by less than 20% of the peak-to-peak signal distance. While one of the signals of the coincidence must have an amplitude greater than twice the noise, this condition is not required for the second signal for which the amplitude V_{op} is an adjustable parameter. Indeed, the magnetic objects which flow close to one of the sensors give rise to coincidences with signals of very different amplitudes, including some that can be very weak on the opposite sensor since the dipolar field decreases in $1/z^3$ (where z is the height in the channel). Only the coincidences of magnetic objects that flow in the centre of the channel have signals of similar amplitude. We then remove the coincidences that have been counted twice, *i.e.*, those for which both simultaneous detected signals have an amplitude V_{op} twice the noise. The coincidences are indexed and we can check in the experimental data that they have all been taken into account (Fig. 5C). From these coincidences, it is then possible to extract different parameters to characterise the detected magnetic objects.

As the magnetic moment μ at 90 mT of one superparamagnetic bead has been determined beforehand by

the vibrating sample magnetometer magnetisation measurement, it is then possible to calculate its H_y dipolar field sensed by both sensors at the position z_B by using eqn (6) as well as the amplitude of the corresponding signals according to eqn (3). The number of beads contained by the magnetic object, giving rise to a coincidence, is obtained by calculating the ratio of the experimental signal and the signal corresponding to one magnetic bead.

Fig. 7 presents the parameters extracted from the signal processing detailed above, obtained for the specific sample and the negative control described in "Preparation of the samples and experimental protocol". The resulting coincidences thus comprise a signal whose amplitude is higher than twice the LOD and the amplitude of the second signal was fixed at the LOD *i.e.*, to an SNR of 1. Fig. 7A shows the number of coincidences as a function of the flow height z_B (26 μm ; total height of the channel without taking into account the spacers) obtained for both samples. It can be seen that most of the magnetic objects giving rise to a coincidence for the specific sample as well as for the negative control flow at the centre of the microfluidic channel. This means that the treatment of the signals with a single velocity as an adjustable parameter is consistent. Fig. 7B shows the histogram of the number of coincidences as a function of the number of beads present on the magnetic objects (aggregates for the negative control, aggregates and labelled cells in the specific sample).

The magnetic objects in the negative sample that generate coincidences in the centre of the channel, with imposed amplitude criteria described above, are aggregates that contain at least 10 beads as predicted by the calculation of the dipolar fields respectively emitted by the top and the bottom sensors for magnetic objects containing various numbers of magnetic beads (Fig. 6C). This number of coincidences for the negative control represents less than 9% of the number of coincidences obtained for the specific one. Smaller aggregates are thus eliminated by the conditions on the amplitude of the signals. Most aggregates detectable by GMR contain between 15 and 25 beads.

The specific sample (red histogram) contained the same supernumerary concentration of beads, 1.5×10^7 beads per mL, as the negative sample. In the theoretical case of perfect labelling with complete steric occupancy of all 7×10^3 NS1, about 150 beads will bind per cell (section "Preparation of the samples and experimental protocol"). Only 10^6 beads are used. This means that there are still 1.4×10^7 supernumerary beads in the sample. In fact, this number is even higher since a visual study by optical microscopy showed that the NS1 cells are targeted by an average at least 60 beads. For this reason, two populations are observed in the histogram of the specific sample. One can observe the coincidences generated by a low number of beads corresponding to bead aggregates as in the negative control, but one can also see the distinct emergence of another population, which represents 99% of the coincidences corresponding to magnetic objects containing more than 25 beads that can therefore be

attributed to labelled cells. These data are consistent with the microscope visualisation. The largest aggregates are one-off events in the case of the negative sample.

Thus, we consider that above 25 beads, detected objects are labelled cells (more likely) or massive bead aggregates (possible but unlikely, confirmed by the histogram from Fig. 7B showing that such events are occasional). Below 25 beads, there is high probability that detected objects are aggregates rather than very poorly labelled cells. These last poorly labelled cells will not be counted as targets of interest and will be considered as aggregates but as you can see in Fig. 3B, cells are rarely labelled with less than 25 beads. We really think that, thanks to the determination of the magnetic moment of the detected objects, the newly developed two-stage GMR sensor-based lab-on-a-chip enables a better distinction between bead aggregates and labelled cells, and a better distinction between false positive and false negative than the previous "one-stage" GMR sensor.⁷ The blue histogram, which corresponds to the negative control containing the same quantity of anti-CD138 antibody functionalized beads as used in the specific sample to label the cells, contains very few events (aggregates) of more than 25 beads. In the specific sample (red histogram), we find these aggregates which extend between 15 and 25 beads but we see a new population of events >25 beads appearing which thus correspond to the labelled cells.

Being able to distinguish non-specific magnetic objects (MP aggregates) allows the identification of false positives and thus increases the specificity and sensitivity of the diagnostic test.

In the case of these first experiments to test the biochip, 1 μm magnetic beads visible under the optical microscope were chosen in order to control the labelling of the NS1 cells as well as the aggregation of the beads. It was thus possible to ensure the consistency of the results obtained in the histograms. In the next experiments, which will consist in evaluating the performances of the new GMR device, beads of nanometric size will be used. Biological objects (cells or bacteria) will thus be labelled with a larger number of beads. The difference between the different populations constituting the specific sample and the negative controls will thus be even more significant.

Conclusion

The use of this two-stage biochip for the dynamic detection one by one of labelled biological objects, by using GMR sensors placed on both sides of the microfluidic channel, is very promising for the development of early diagnostic tests. Indeed, for the first time, thanks to this technique coupled with a robust treatment of the signals, it is possible to determine the magnetic moment as well as the flow height of the magnetic objects flowing in the channel and thus to discriminate the aggregates of beads from the targeted biological objects. This offers a great opportunity to increase specificity and sensitivity. A complete biological study is in

View Article Online

Lab on a Chip

Paper

progress to evaluate the performance (sensitivity, specificity) of this new GMR biochip. Moreover, this device is inexpensive and transportable and it easy to adapt the height of the channel to the size of the biological objects studied. It therefore has the potential to become a very competitive early diagnostic tool.

Author contributions

Maïkane Deroo, Manon Giraud, Cécile Féraudet-Tarisse and Guénaëlle Jasmin-Lebras are the main contributors to this work. François-Damien Delapierre and Florent Malloggi helped with the microfluidics design. Pierre Bonville was involved in the creation of the data processing programs. Mathieu Jeckelmann, Mathieu Thévenin and Frédéric Coneggo did the electronics. Claude Fermon contributed to sensor methodology, design and acquisition software. Aurélie Solignac performed the GMR stack deposition. Elodie Fabre-Paul dealt with sensor microfabrication, and Stéphanie Simon dealt with the analysis and supervised the work.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Marc Plaisance and Stéphanie Gelhaye for their help concerning NS1 culture cells as well as Anne Wijkhuisen for her precious advice. We would like to thank Gregory Cannies for his help with technical issues, Myriam Pannetier-Lecoeur for GMR stack deposition and annealing and Anne-Marie Haghiri-Gosnet for fruitful scientific exchanges. The authors also acknowledge the Ile-de-France region with its DIM ELICIT program, the CEA transverse programs “Techno-Santé” and “PTC Instrumentation et Détection” and the Direction Générale de l'Armement for their funding contributions.

References

- J. Laporte, C. Savin, P. Lamourette, K. Devilliers, H. Volland, E. Carniel, C. Creminon and S. Simon, *J. Clin. Microbiol.*, 2015, **53**, 146–159.
- S. Adem, S. Jain, M. Sveiven, X. Zhou, A. J. O'Donoghue and D. A. Hall, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 7941.
- D. Su, K. Wu, R. Saha, C. Peng and J. P. Wang, *Micromachines*, 2019, **11**, 34.
- M. Muluneh and D. Issadore, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, **66**, 101–109.
- M. D. Cubells-Beltran, C. Reig, J. Madrenas, A. De Marcellis, J. Santos, S. Cardoso and P. P. Freitas, *Sensors*, 2016, **16**, 939.
- J. Loureiro, C. Fermon, M. Pannetier-Lecoeur, G. Arrias, R. Ferreira, S. Cardoso and P. P. Freitas, *IEEE Trans. Magn.*, 2009, **45**, 4873–4876.
- M. Giraud, F. D. Delapierre, A. Wijkhuisen, P. Bonville, M. Thevenin, G. Cannies, M. Plaisance, E. Paul, E. Ezan, S. Simon, C. Fermon, C. Féraudet-Tarisse and G. Jasmin-Lebras, *Biosensors*, 2019, **9**, 105.
- A. Fert, *Reflets Phys.*, 2009, **15**, 5–10.
- B. Diény, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1994, **136**, 335–359.
- B. Diény, V. S. Speriosu, S. S. Parkin, B. A. Gurney, D. R. Wilhoit and D. Mauri, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1991, **43**, 1297–1300.
- B. Diény, V. S. Speriosu, S. Metin, S. S. P. Parkin, B. A. Gurney, P. Baumgart and D. R. Wilhoit, *J. Appl. Phys.*, 1991, **69**, 4774–4779.
- J. Nogués and I. K. Schuller, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1999, **192**, 203–232.
- A. V. Silva, D. C. Leitao, J. Valadeiro, J. Amaral, P. P. Freitas and S. Cardoso, *Eur. Phys. J.: Appl. Phys.*, 2015, **72**, 10601.
- M. Pannetier-Lecoeur, C. Fermon, A. de Vismes, E. Kerr and L. Vieux-Rochaz, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, **316**, e246–e248.
- A. Bertsch and P. Renaud, *Micromachines*, 2015, **6**, 790–792.
- V. Pinto, P. Sousa, V. Cardoso and G. Minas, *Micromachines*, 2014, **5**, 738–755.
- M. Agostini, G. Greco and M. Cecchini, *APL Mater.*, 2019, **7**, 081108.
- J. Lachaux, C. Alcaine, B. Gomez-Escoda, C. M. Perrault, D. O. Duplan, P. J. Wu, I. Ochoa, L. Fernandez, O. Mercier, D. Coudreuse and E. Roy, *Lab Chip*, 2017, **17**, 2581–2594.
- Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman and Y. H. Lo, *Sens. Actuators, B*, 2004, **97**, 402–408.
- S. Bedanta and W. Kleemann, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2009, **42**, 013001.
- G. Li, S. Sun, R. J. Wilson, R. L. White, N. Pourmand and S. X. Wang, *Sens. Actuators, A*, 2006, **126**, 98–106.
- N. Pamme, *Lab Chip*, 2006, **6**, 24–38.
- S. Ekelof, *Engineering Science & Education Journal*, 2001, **10**, 37–40.
- Y. Xiaoning, D. A. Hockanson, L. Min, R. Yong, C. Wei, J. L. Drewniak and R. E. DuBroff, *IEEE Trans. Electromagn. Compat.*, 2001, **43**, 538–548.
- C. Chopin, J. Torrejon, A. Solignac, C. Fermon, P. Jendritzka, P. Fries and M. Pannetier-Lecoeur, *ACS Sens.*, 2020, **5**, 3493–3500.
- J. Moulin, A. Doll, E. Paul, M. Pannetier-Lecoeur, C. Fermon, N. Sergeeva-Chollet and A. Solignac, *Appl. Phys. Lett.*, 2019, **115**, 122406.
- J. Torrejon, A. Solignac, C. Chopin, J. Moulin, A. Doll, E. Paul, C. Fermon and M. Pannetier-Lecoeur, *Phys. Rev. Appl.*, 2020, **13**, 034031.
- G. Li, S. X. Wang and S. Sun, *IEEE Trans. Magn.*, 2004, **40**, 3000–3002.
- A. C. Fernandes, C. M. Duarte, F. A. Cardoso, R. Bexiga, S. Cardoso and P. P. Freitas, *Sensors*, 2014, **14**, 15496–15524.

8 - Résumé



Maikane DEROO

Titre : Biopuce à deux étages à base de capteurs à magnétorésistance géante pour du diagnostic précoce d'objets biologiques microniques

Mots clés : Magnétisme, biopuce, microfluidique, diagnostic, immunoanalyse

Résumé : Le développement de techniques de diagnostic précoce, rapides, sensibles, peu coûteuses et transportables au chevet du patient est un défi dans le domaine de la santé mais aussi dans celui de la défense ou de l'environnement. Actuellement, parmi les dispositifs de diagnostic faciles à utiliser, il existe des tests bandelettes dans lesquels les cibles migrent dans la cellulose mais ils ne sont souvent pas adaptés aux gros objets tels que les cellules ou certaines bactéries, et ils manquent de sensibilité. D'autres méthodes utilisées en routine dans les laboratoires de biologie, comme les tests ELISA ou PCR, ont de meilleures sensibilités mais nécessitent un personnel qualifié. Dans les hôpitaux, la détection d'objets biologiques un par un est souvent effectuée par cytométrie en flux, mais là encore, l'équipement est assez volumineux, coûteux et il est nécessaire de former le personnel à son utilisation complexe. La détection optique n'est toujours pas adaptée à certaines matrices opaques et la détection électrochimique ou magnétique statique présente trop d'interactions non spécifiques. Dans ce contexte, nous proposons une biopuce brevetée, à base de capteurs à magnétorésistance géante (GMR), pour détecter des objets biologiques en très petites quantités, dans des matrices complexes sans étape de lavage préalable. Cette approche est basée sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées par des anticorps monoclonaux, dirigés contre les objets biologiques cibles. Leur détection dynamique, après interaction avec les nanoparticules magnétiques, est réalisée par les capteurs GMR qui permettent de compter un par un les objets biologiques magnétiquement marqués de façon spécifique et ciblée.

Des résultats très prometteurs ont été obtenus avec le premier prototype de biopuce qui consiste en un canal microfluidique placé au-dessus d'un capteur GMR et développé sur un modèle cellulaire eucaryote (de taille 10 μm), permettant d'atteindre des sensibilités et spécificités légèrement inférieures à celles obtenues sur le même modèle biologique en test ELISA, avec une plus grande facilité d'utilisation et un léger gain de temps. Jusqu'à présent, la principale limite était les agrégats de billes qui conduisaient à des faux positifs.

La nouvelle biopuce brevetée et étudiée dans cette thèse dispose de capteurs GMR disposés face à face de part et d'autre du canal microfluidique, ce qui permet de détecter simultanément chaque objet magnétique. Pour la première fois, grâce à cette technique, et après plusieurs mises au point, il est possible de déterminer le moment magnétique des objets circulant dans le canal et ainsi de distinguer les agrégats de billes des objets biologiques ciblés. Cette technique de détection permet d'obtenir, toujours sur le même modèle cellulaire eucaryote, une sensibilité environ 100 fois supérieure à celle obtenue avec le test ELISA ou avec le premier prototype rendant cette biopuce très compétitive.

Enfin, quelques premiers tests prometteurs ont été réalisés au moyen d'une biopuce redimensionnée pour détecter des objets biologiques de plus petite taille (de l'ordre du micromètre): des bactéries avec un modèle non pathogène pour l'homme et facilement manipulable, *Xanthomonas arboricola*. Ces derniers essais prouvent la versatilité potentielle du domaine d'application de la biopuce GMR.

Title : Two-stage biochip based on giant magnetoresistance sensors for early diagnosis of micronic biological objects

Keywords : Magnetism, biochip, microfluidics, diagnosis, immunoanalysis

Abstract : The development of early diagnosis techniques, that are fast, sensitive, inexpensive and point of care, is a challenge in the field of health but also in the field of defense or the environment. Currently, among the easy-to-use diagnostic devices, there are strip tests in which the targets migrate in the cellulose but they are often not adapted to large objects such as cells or certain bacteria, and they lack sensitivity. Other methods used routinely in biology laboratories, such as ELISA or PCR tests, have better sensitivities but require a qualified staff. In hospitals, the detection of biological objects one by one is often performed by flow cytometry, but here again, the equipment is quite bulky, expensive and it is necessary to train staff to its complex use. Optical detection is still not adapted to some opaque matrices and electrochemical or static magnetic detection presents too many non-specific interactions. In this context, we propose a patented biochip, based on giant magnetoresistance (GMR) sensors, to detect biological objects in very small quantities, in complex matrices without a prior washing step. This approach is based on the use of magnetic nanoparticles functionalized by monoclonal antibodies, directed against target biological objects. Their dynamic detection, after interaction with magnetic nanoparticles, is achieved by GMR sensors that allow to count one by one the magnetically marked biological objects in a specific and targeted way.

Very promising results have been obtained with the first biochip prototype which consists of a microfluidic channel placed above a GMR sensor and developed on a eukaryotic cell model, allowing to reach sensitivities and specificities slightly lower than those obtained on the same biological model in ELISA, with a greater ease of use and a slight time gain. Until now, the main limitation was bead aggregation which led to false positives.

The new patented biochip has GMR sensors arranged face-to-face on both sides of the microfluidic channel, allowing each magnetic object to be detected simultaneously. For the first time, thanks to this technique, and after several developments, it is possible to determine the magnetic moment of the objects circulating in the channel and thus to discriminate bead aggregates from targeted biological objects. This detection technique allows to obtain a sensitivity approximately 100 times higher than the one obtained with the ELISA test or with the first prototype making this biochip very competitive.

Finally, some promising first tests have been performed using a resized biochip to detect smaller biological objects (in the micrometer range): bacteria with a non-pathogenic and easily manipulated model, *Xanthomonas arboricola*. These latest tests prove the potential versatility of this GMR biochip application field.