



HAL
open science

Un laboratoire sur puce pour la séparation et la qualification des vésicules extracellulaires

Lyne Pillemont

► **To cite this version:**

Lyne Pillemont. Un laboratoire sur puce pour la séparation et la qualification des vésicules extracellulaires. Biotechnologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30168 . tel-03531299v2

HAL Id: tel-03531299

<https://laas.hal.science/tel-03531299v2>

Submitted on 20 Jun 2022

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

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



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par Université Toulouse 3 - Paul Sabatier**

**Présentée et soutenue par
Lyne PILLEMONT**

Le 27 octobre 2021

**Un laboratoire sur puce pour la séparation et la qualification des
vésicules extracellulaires.**

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique, Electronique, Télécommunications
et Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **Ingénierie pour le vivant et pour la santé**

Unité de recherche :
LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Anne-Marie GUE

Jury

Mme Myriam TAVERNA, Rapporteur, Professeur, Université Paris-Saclay, Institut Galien
Mme Marie-Caroline JULLIEN, Rapporteur, Directrice de Recherche, Institut de Physique de Rennes
M. Patrice BACCHIN, Président, Professeur, Université Toulouse 3
Mme Céline ELIE-CAILLE, Examinatrice, Maître de Conférence, Institut FEMTO-ST
Mme Anne-Marie GUE, Directrice de thèse, Directrice de Recherche, LAAS-CNRS

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier ma directrice de thèse Anne-Marie Gué. Elle m'a accordé sa confiance au cours de ces quatre années, tout d'abord en tant que stagiaire puis en tant que doctorante. Je lui suis reconnaissante de m'avoir encadrée et soutenue tout le long de ces travaux, malgré un contexte particulier. Je pense que nous nous souviendrons longtemps, toutes les deux, de cette fin de thèse particulière.

Je tiens également à remercier Marie Caroline Jullien et Myriam Taverna d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse en tant que rapporteuses malgré de fortes contraintes de temps. Merci à Patrice Bacchin d'avoir présidé ce jury ainsi qu'à Céline Elie-Caille d'avoir accepté d'assister et de prendre part à cette soutenance.

Merci à l'ANR MADNESS d'avoir soutenu et financé ce projet et la collaboration avec le partenaire Femto-ST à Besançon.

Je souhaite aussi remercier les différents services techniques du LAAS-CNRS. Pour le service I2C, Charline Blatché et Sandrine Assié-Souleille pour votre aide et votre soutien en salle de biologie, Xavier Dollat pour la réalisation des différentes pièces métalliques et Julien Roul pour la résolution des problèmes des microscopes. Pour le service TEAM, merci à Adrian Laborde et Laurent Mazenc pour nos nombreuses heures en zone de photolithographie, à David Colin et Pierre-François Calmon pour la conception des différents masques, à Aurélie Lecestre et Fabien Mesnilgrete pour les formations en zones de traitement de surface mais également à Samuel Charlot pour la réalisation des différentes découpes de nos dispositifs si particuliers. A Véronique Conedera pour son regard d'experte sur les différentes technologies développées en salle blanche et pour les nombreuses discussions. Aussi, je souhaite tout particulièrement remercier Remi Courson pour le partage de son savoir-faire qui nous a permis de mener à bien ce projet.

Merci à l'équipe MILE avec qui j'ai partagé de nombreux moments au cours de ces quatre années. Merci Pierre Joseph et Morgan Delarue pour leur remarques intéressantes et toujours constructives. Sans oublier Baptiste (avoue-le c'était sympa de travailler ensemble, toujours inséparables au bout de 7 ans), Paul (ta chanson du vendredi soir restera inoubliable), Zack (nos discussions par microscopes interposés vont me manquer), mais aussi Lucas (à ton tour maintenant), Lucie (courage avec Baptiste), Tiphaine (ta bonne humeur et tes gourmandises), Jeffrey (le résistant du bureau A9a). Sans oublier les derniers arrivés ou revenants (Inga, Laure, Mohammad, Sylvain, TERENCE).

Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans la bonne humeur et les nombreux moments de partage et de discussions avec Alexandre dit Poussin, Clothilde, Dominique, Mathieu, Timothée et Jérôme (merci !!!). Sans oublier mes anciens albigeois Raph (Polo, Momo et Jo) ainsi que les doigts de fée de Charline !

Enfin, je ne pourrai remercier suffisamment ma famille. Merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel, leurs conseils, leur dévouement et leur amour sans faille. A ma sœur Léa, à notre aventure commune que je n'oublierai jamais, à sa joie de vivre : mon rayon de soleil. A ma famille (les taties et tonton, les cousines et grands-parents) et à ma nouvelle famille (Christine et Thierry et Ronan et Naia).

Enfin, je ne pourrai avoir de mot assez fort pour remercier celui qui partage mon quotidien. Merci d'avoir été là pour moi dans ce moment si important, de m'avoir aidé, soutenue, apaisée et motivée quand il le fallait. Merci infiniment Gaël.

RESUME

Les vésicules extracellulaires (ou EVs) sont des sous-espèces cellulaires, de tailles nanométriques et hétérogènes, libérées par toutes les cellules de l'organisme. Elles circulent librement dans les fluides biologiques et sont aujourd'hui considérées comme de potentiels marqueurs et indicateurs de nombreuses maladies. Ainsi, les identifier et les caractériser reste un défi majeur qui pourrait conduire à des diagnostics et pronostics rapides de nombreuses pathologies. Cependant, de par leurs tailles hétérogènes, aucune technique actuelle ne permet de bien les quantifier et les caractériser. Ainsi, seule une combinaison de technologies pourrait permettre de fournir des informations importantes sur ces espèces d'intérêts. Dans ce but, ce travail de thèse a pour objectif de développer un laboratoire sur puce qui permettrait d'isoler les EVs à partir d'un fluide biologique.

Le laboratoire sur puce est basé sur un principe de filtration hydrodynamique permettant la séparation des EVs provenant de milieux complexes. Ce principe permet de séparer les particules selon une taille définie. Il s'agit d'une méthode simple et passive (aucun champ extérieur), robuste et moins sujette au risque de colmatage. Son principe est basé sur l'exclusion en taille des particules dont le diamètre est supérieur à une valeur définie, appelée le rayon de coupure, définie par le rapport des débits entre une canalisation principale et une ou plusieurs canalisations latérales. En choisissant judicieusement les dimensions des canalisations, il a été possible de concevoir plusieurs dispositifs permettant la séparation à un rayon de coupure donné. Nous avons conçu et fabriqué, des puces microfluidiques permettant la séparation des particules à un rayon de coupure adapté à l'application des EVs (entre 150 et 900 nm). Nous avons utilisé une technique originale basée sur le laminage successif de films secs (DF) et la photolithographie. Nous avons fait la preuve de concept à l'aide de trois nanoparticules biofonctionnalisées fluorescentes (NP 140-CAS, N 480-OVA et NP 920) couvrant la gamme de distribution des EVs. Une fois la validation faite dans des milieux synthétiques, nous avons décidé de complexifier les mélanges et nous avons injecté des milieux biologiques associés à de nanoparticules dans les dispositifs de tri. Une fois les différentes séparations effectuées, nous avons pu quantifier et analyser à l'aide de différentes techniques (par Tunable Resistive Pulse Sensing, par cytométrie de flux, par comptage directe) nos échantillons. Nous avons démontré qu'à l'aide de nos dispositifs, nous pouvons récolter 35 μ L d'échantillon filtré en 30 minutes d'injection ce qui est hautement compatible avec les exigences de l'analyse de quantification. Nous avons comparé chaque échantillon filtré avec ceux injectés et nous avons observé des concentrations identiques pour les nanoparticules de taille inférieure (NP 140-CAS, NP 480-OVA) au rayon de coupure, nous

indiquant un rendement de 100 % de récupération. Pour les autres nanoparticules (NP 920) et les grosses cellules présentes dans les milieux biologiques (globules rouges, blancs, etc...) nous avons obtenu un rendement de filtration de l'ordre de 96 à 98%. Nous démontrons ainsi que l'utilisation de fluide biologique (sang, plasma, PPL), n'affecte en aucun cas les résultats de séparation. Ceci prouve que cette méthode de séparation est un bon candidat pour le traitement des échantillons naturels et pourrait être la base d'une nouvelle génération de tests diagnostiques.

Mot clefs : Vésicules extracellulaires, Microfluidique, Filtration hydrodynamique, Tri cellulaire, Film sec

ABSTRACT

Extracellular vesicles (or EVs) are heterogeneous nano-sized cellular subspecies released by all cells in the body. They circulate freely in biological fluids and are today considered as potential markers and indicators of many diseases. Thus, identifying and characterizing them remains a major challenge that could lead to rapid diagnosis and prognosis of many diseases. However, due to their heterogeneous sizes, no current technique allows for their proper quantification and characterization. Thus, only a combination of technologies could provide important information on these molecules of interest. To this end, this thesis aims at developing a lab on chip that would allow the isolation of EVs from a biological fluid. To achieve this separation, we chose to use hydrodynamic filtration. This principle allows the separation of particles according to a defined size. It is a simple and passive method (no external field), robust and less prone to clogging than standard filtration techniques. Its principle is based on the size exclusion of particles whose diameter is greater than a defined value, called the cut-off radius, monitored by the ratio of flow rates between a main channel and one or more side channels. We have designed and manufactured microfluidic chips allowing the separation of particles at a cut-off radius adapted to the EV application (between 150 and 900 nm). We used an original microfabrication technique based on successive dry film lamination (DF) and photolithography to manufacture the devices. We demonstrated the proof of concept using three fluorescent biofunctionalized nanoparticles (NP140, N480 and NP 920) covering the EV distribution range. Once the validation was done in synthetic media, we injected biological media spiked with nanoparticles into the sorting devices. We were able to quantify and analyze filtered samples using different techniques (Tunable Resistive Pulse Sensing, flow cytometry, direct counting). We have demonstrated that using our device we were able to collect 35 μ L of filtered sample within 30 minutes which is highly compatible with the requirements of the subsequent quantification analysis. We compared filtered samples to injected samples and observed identical concentrations for the nanoparticles (NP 140-CAS, NP 480-OVA) smaller than the cut-off radius, indicating a 100% recovery yield. For nanoparticles larger than the cut off radius (NP 920) and cells present in the biological media (red and white blood cells, etc.) we obtained a filtration yield of the order of 96 to 98 %. We thus demonstrate that the use of biological fluid (blood, plasma, PPL), does not affect the separation results in any way. These results proved that this separation method is a good candidate for treatment of natural samples and could serve as a new range of diagnostic and prognostic tests for pathologies.

Key words: Extracellular vesicles, Microfluidic, Hydrodynamic filtration, Cell sorting, Dry film

ACRONYMES

Alix	ALG-2 Interacting protein X
AF4	<i>Asymmetrical flow field-flow fractionation</i>
AFM	Microscopie à force atomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAS	Caséine
DF	<i>Dry Film</i>
DLD	<i>Deterministic Lateral Displacement</i>
EVs	Vésicules extracellulaires
FDTs	Perfluorodecyltrichlorosilane
FFFF	<i>Flow Field-Flow Fractionation</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
ILV	Vésicules intraluminale
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
MVE	Corps multivésiculaire
MVs	Microvésicules
NBA	NanoBioAnalytique
NPs	Nanoparticules
np	Nanopores
OVA	Ovalbumine
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEB	<i>Post Exposure Bake</i>
PEG	Polyéthylène glycol

PPL	<i>Platelet Pellet Lysate</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SiO ₂	Dioxyde de silicium
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SPRi	Imagerie par Résonance de Plasmons de Surface
SSC	<i>Side Scatter</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
TRPS	<i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i>
UC	Ultracentrifugation
UV	Ultraviolet

SOMMAIRE

Remerciements.....	iii
Résumé	v
Abstract.....	vii
Acronymes.....	ix
Sommaire	xi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : SEPARATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES : ETAT DE L'ART ET POSITIONNEMENT DU PROJET.....	5
I. Les vésicules extracellulaires	7
I.1. Découverte des vésicules extracellulaires	8
I.1.a. Les exosomes.....	9
I.1.b. Les microvésicules.....	11
I.2. Rôles biologiques et pathologiques des EVs.....	12
I.3. Récapitulatif des différentes classes d'EVs	13
II. Les techniques de purification et d'isolement des EVs	13
II.1. Méthode de purification par la taille	14
II.1.a. Chromatographie d'exclusion par la taille (SEC)	14
II.1.b. Fractionnement par écoulement de champ (FFF).....	15
II.1.c. Filtration et ultrafiltration	15
II.2. Ultracentrifugation	16
II.3. Précipitation	17
II.4. Les méthodes d'immunocapture	18
II.5. Les dispositifs microfluidiques	18
II.5.a. L'acousto-fluidique	19
II.5.b. Déplacement latéral déterministe (DLD).....	20
II.6. Récapitulatif des différentes techniques de purification des EVs	22
III. Motivations et objectifs de la thèse.....	26

CHAPITRE II : PRINCIPE DE LA FILTRATION HYDRODYNAMIQUE ET TECHNOLOGIES DE FABRICATION DES DISPOSITIFS 29

I.	Principe du dispositif de tri.....	31
I.1.	Principe de la filtration hydrodynamique.....	31
I.2.	Calcul des dimensions des puces microfluidiques.....	34
I.2.a.	Dispositif 2D – Premier dispositif à 1 canalisation secondaire.....	37
I.2.b.	Dispositif 2D – Dispositif à 10 canalisations secondaires.....	38
I.2.c.	Dispositif 3D – Dispositif à 100 canalisations secondaires.....	39
I.2.d.	Dispositif 3D – Dispositif adapté au tri des exosomes.....	43
I.3.	Récapitulatif des différents dispositifs microfluidiques réalisés.....	44
II.	Technologie de fabrication des puces microfluidiques.....	45
II.1.	Présentation de la technologie « films secs ».....	46
II.1.a.	Préparation du substrat et des ouvertures fluidiques.....	46
II.1.b.	Réalisation du réseau de canalisation.....	47
II.1.c.	Scellement des dispositifs.....	48
II.1.d.	Techniques de fabrication 3D des puces microfluidiques.....	49
II.2.	Technologie PDMS.....	52
III.	Conclusion.....	54

CHAPITRE III : SEPARATION DE PARTICULES SUBMICROMETRIQUES PAR FILTRATION HYDRODYNAMIQUE 57

I.	Protocole et observation des dispositifs de tri.....	59
I.1.	Présentation du banc expérimental.....	59
I.2.	Préparation des échantillons synthétiques : billes fluorescentes.....	60
I.3.	Tests microfluidiques de validation des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires.....	62
I.4.	Tests microfluidiques sur les dispositifs à 100 canalisations secondaires à l'aide de billes synthétiques.....	64
I.5.	Étude de la filtration de solutions de billes monodisperses.....	67
I.5.a.	Mesure « témoin ».....	69
I.5.b.	Caractérisation de la filtration des NP 480-OVA.....	70
I.5.c.	Caractérisation de la filtration des NP 920.....	75

I.5.d.	Caractérisation de la filtration des NP 140-CAS	77
I.6.	Filtration de mélanges de billes synthétiques	79
I.7.	Caractérisation des mélanges de billes synthétiques	80
I.7.a.	Mélange 1 : NP 480-OVA et NP 920	80
I.7.b.	Mélange 2 : NP 140-CAS et NP 920	83
I.8.	Interprétations des résultats	84
II.	Tests de filtration d'échantillons biologiques.....	88
II.1.	Préparation et tests de filtration d'échantillon de plasma	89
II.1.a.	Préparation des échantillons	89
II.1.b.	Tests de filtration d'échantillon de plasma	89
II.2.	Caractérisation des échantillons de plasma	90
II.2.a.	Analyse par cytométrie en flux et calibration des différents NPs.....	91
II.2.b.	Analyse par cytométrie du mélange de NP 480-OVA avec des NP 920	94
II.2.c.	Analyse par cytométrie du plasma dilué 10 fois avec des NP 480-OVA	95
II.2.d.	Analyse par cytométrie du plasma dilué 2 fois avec des NP 480-OVA ou NP 920	96
II.2.e.	Conclusion	97
II.3.	Préparation et test de filtration d'échantillon de sang	98
II.3.a.	Filtration d'un mélange de sang complet et de billes	99
II.3.b.	Caractérisation des tests de filtration par comptage de cellules	100
II.3.c.	Analyse de la filtration d'un échantillon de sang dilué 100 fois	100
II.3.d.	Analyse de la filtration d'un échantillon de sang dilué 10 fois	103
II.3.e.	Conclusion	105
III.	Conclusion et perspectives.....	105

CHAPITRE IV : LABORATOIRE SUR PUCE DE TRI ET DE CAPTURE DES VESICULES EXTRACELLULAIRES..... 109

I.	Laboratoire sur puce MADNESS : association des modules de tri et de capture pour la séparation et la qualification des EVs	111
I.1.	Description du module NBA	111
I.2.	Connexion des modules de tri et de capture : présentation du laboratoire sur puce de séparation et d'immunocapture complet	113

II. Tri et capture de mélanges contenant des NPs, présentation des conditions expérimentales de complexité croissante	115
II.1. Présentation des expériences réalisées par SPRi en conditions idéales	115
II.2. Présentation des expériences réalisées avec le LOC complet	118
II.2.a. Résultats de filtration-capture.....	118
II.2.b. Comparaison des résultats avec la plateforme NBA et conclusion	121
III. Expériences en milieu biologique : mélange de nanoparticules NPs diluées avec lysat plaquettaire et en plasma	121
III.1. Étude d'un mélange de NPs en présence de PPL.....	122
III.1.a. Présentation des densités surfaciques des différents spots.....	125
III.1.b. Comparaison des expériences en PPL et en PBS.....	127
III.2. Étude d'un mélange de NPs et de plasma.....	128
III.2.a. Présentation des densités surfaciques des différents spots.....	131
III.2.b. Comparaison des densités surfaciques des échantillons en plasma sanguin et en PBS-Tween20	133
IV. Conclusion et perspectives.....	135
CONCLUSION GENERALE	137
Annexes.....	A
Références bibliographiques.....	I
Publications	XII

INTRODUCTION GENERALE

Les vésicules extracellulaires, notées EVs, sont des espèces sub-cellulaires, de taille nanométrique, libérées dans des conditions physiologiques particulières, par une très grande majorité des cellules de l'organisme. Présentes dans l'ensemble des fluides corporels, les EVs sont aujourd'hui considérées comme des indicateurs de pathologies. Par conséquent, l'identification et la caractérisation de ces nouveaux biomarqueurs, à partir d'échantillons biologiques, permettraient de mener des tests de diagnostic et de pronostic d'une large gamme de pathologies. Toutefois, en raison de leur complexité en termes de taille, d'origine et marqueurs membranaires, il n'existe, à ce jour, pas de méthode idéale pour leur quantification et caractérisation. Le lien entre leur structure et leur fonction n'est toujours pas établi et les limites instrumentales à déterminer clairement l'ensemble des sous espèces, leur taille ou encore l'expression des marqueurs membranaires constituent, aujourd'hui, un frein à l'étude fondamentale et ne permettent pas d'envisager le développement de diagnostic performants et simple d'utilisation.

Ainsi, dans le but de contourner ces difficultés, une combinaison de technologies peut permettre de fournir ces informations cruciales pour mieux comprendre ces espèces subcellulaires si intéressantes et pourrait amener à des avancées prometteuses ainsi que la percée de nouveaux tests diagnostiques.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse propose le développement d'une plateforme miniaturisée permettant d'isoler, fractionner et classifier les EVs à partir d'un échantillon biologique. Pour cela, une approche microfluidique, couplant un module de tri, développé et réalisé au LAAS-CNRS, à Toulouse, et un module de capture, développé à l'institut FEMTO-ST à Besançon, a été imaginé. La conception de ces modules connectés, pourrait permettre une approche multiparamétrique et multifonctionnelle, ouvrant la voie à des instrumentations génériques menant à la qualification des nombreuses nanoparticules.

Cette thèse se focalise sur le développement du module de séparation. Les travaux effectués seront présentés au travers de quatre chapitres.

Le **premier chapitre** introduira les notions permettant de mieux comprendre notre sujet d'étude. Pour cela, dans un but de mieux appréhender le rôle important de ces nouvelles cibles biologiques, une rapide description des vésicules extracellulaires sera présentée. Elle mettra en avant les difficultés de classification ainsi que leur possible rôle biologique montrant leur atout pour le diagnostic de maladies. Ensuite, une présentation des techniques actuellement utilisées permettant la purification et l'isolement des vésicules extracellulaires sera donnée. Une comparaison de ces méthodes sera réalisée. Enfin, ce chapitre se

terminera par une présentation des objectifs de la thèse et de la stratégie mise en place afin de répondre à la problématique de départ.

Le **deuxième chapitre** présentera le principe fonctionnel retenu pour implémenter la séparation des EVs, la filtration hydrodynamique. Les différents dispositifs conçus et réalisés seront décrits ainsi que leurs techniques de fabrication (films secs photosensibles et PDMS). L'évolution, les observations et les perspectives d'amélioration de l'ensemble de ces dispositifs permettra de conclure cette partie.

Le **troisième chapitre** sera consacré à la présentation des expériences microfluidiques réalisées sur différents dispositifs de tri. Une première partie sera dédiée à la mise en œuvre des expériences de séparation et à la préparation des échantillons à analyser. Il présentera également les différentes analyses quantitatives réalisées afin de qualifier le processus de filtration. Ce chapitre se terminera par une conclusion mettant en avant les résultats obtenus ainsi que les potentielles améliorations à amener sur les dispositifs et échantillons.

Un **quatrième chapitre** présentera l'assemblage des modules de tri et de capture dans le but de répondre au projet initial de séparation et fractionnement des vésicules extracellulaires. Pour cela, dans un premier temps, le fonctionnement du dispositif de capture, réalisé en parallèle, sera succinctement décrit afin de comprendre son mode de fonctionnement. Ensuite, une description des différentes expériences, en milieux synthétiques et en conditions idéales puis en milieux biologiques, sera donnée. Une conclusion terminera ce chapitre, et montrera le comportement des deux dispositifs lors de leur connexion.

**CHAPITRE I : SEPARATION DES VESICULES
EXTRACELLULAIRES : ETAT DE L'ART ET
POSITIONNEMENT DU PROJET**

Les vésicules extracellulaires, notées EVs, sont des vésicules de taille hétérogène libérées par toutes les cellules du corps. Elles circulent librement dans les fluides biologiques et les derniers travaux menés dans le domaine leur confèrent un rôle de marqueurs dans de nombreuses pathologies. Ainsi, les identifier et les caractériser permettrait des avancées majeures dans le diagnostic et le pronostic de maladies. Or, du fait notamment de cette hétérogénéité en taille, les techniques usuelles d'isolement des EVs possèdent toutes des limites.

Après une description des principales caractéristiques des EVs, nous présenterons les principales techniques actuelles de purification applicables aux EVs. Nous décrirons les différentes méthodes de caractérisations des EVs et un inventaire des principaux avantages et inconvénients sera donné. Enfin, pour finir ce chapitre, nous présenterons les objectifs et les motivations de ces travaux de thèse.

I. Les vésicules extracellulaires

Les EVs sont présentes dans tous les fluides biologiques (la salive [1] [2], l'urine [3] [4], le liquide amniotique [5], le lait maternel [6] [7], le liquide séminal [8] [9], le fluide vaginal [10], le cordon ombilical [11], le liquide de lavage broncho-alvéolaire [12] et le sang) et peuvent être libérées par quasiment toutes les cellules. Les EVs entrent également en jeu dans la communication intercellulaire [13] et sont également impliquées dans de nombreux processus physiologiques [14]. Aussi, les EVs peuvent jouer un rôle important dans un nombre considérable de pathologies [15], comme les cancers [16] [17], les maladies cardiovasculaires [18] [19] et les maladies coronaires [20], les maladies rénales [21] [22] ou encore dans les maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer [23] [24]. On pense aujourd'hui que les EVs pourraient avoir un impact déterminant dans le diagnostic et dans le pronostic de ces maladies [25]. Or, les EVs possèdent une large gamme de taille (Figure I.1) allant de 30 nm (soit 100 fois plus petites que les cellules) à environ 1 000 nm de diamètre pour les plus grosses [26]. Aussi, leur caractérisation représente un véritable enjeu car, actuellement, il n'existe pas de technique générique permettant de les isoler et de les analyser de façon simple.

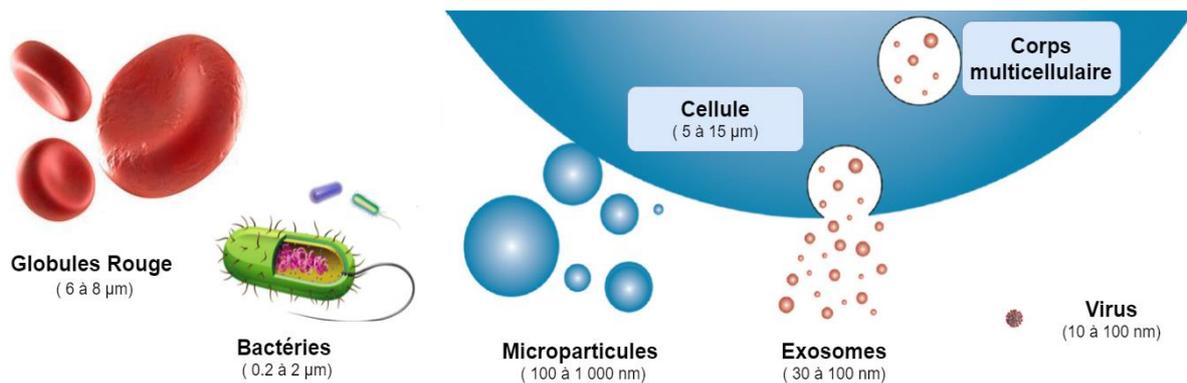


Figure I.1 - Schéma simplifié représentant les différentes particules présentes dans le sang.

I.1. Découverte des vésicules extracellulaires

La découverte des EVs par Erwin Chargaff et Randolph West [27] remonte au milieu du XXI^{ème} siècle. En étudiant le temps de coagulation du plasma selon la vitesse de centrifugation, ils découvrent que le plasma, sans cellule, contenait un facteur subcellulaire favorisant la coagulation du sang. Ils observent alors que, lorsque le plasma est débarrassé des plaquettes, il génère une protéine, la thrombine, dont le taux peut varier selon la vitesse de centrifugation. Ceci était en contradiction avec le principal dogme de la médecine de l'époque qui énonçait que les plaquettes étaient responsables de la coagulation du sang. Simultanément, ils mettaient en évidence la présence de particules subcellulaires qui seront identifiées, plus tard, comme des EVs plaquettaires. Dans la même période, l'ensemble des travaux menés par le britannique Peter Wolf [28], mettait à jour une fraction cellulaire provenant des plaquettes, les « poussières de plaquettes ». Ces dernières possédaient une taille comprise entre 20 et 50 nm de diamètre, étaient présentes dans le plasma et possédaient des propriétés coagulantes. Il aura fallu attendre bien des années plus tard pour que ce terme soit remplacé par le nom de microparticules. Par la suite, de nouveaux travaux, réalisés en microscopie électronique par Webber et Johnson, permettaient la visualisation des vésicules subcellulaires libérées par des plaquettes. D'autres travaux ont permis de caractériser les microparticules du plasma et du sérum (James George, 1981) à l'aide notamment de méthodes d'immunocapture. Il a été montré que la concentration en microparticules plaquettaires était dix fois supérieure dans le sérum que dans le plasma. Ceci confirmait le fait que les plaquettes n'étaient pas la seule source d'origine des microparticules.

Au cours des dernières décennies, les avancés dans ce domaine ont permis d'établir que (1) les microparticules proviennent de nombreux types cellulaires et (2) qu'elles jouent un rôle de médiateur dans la coagulation sanguine. Les vésicules sont aujourd'hui un domaine majeur dans la recherche mondiale comme en atteste les courbes suivantes [29] (Figure I.2).

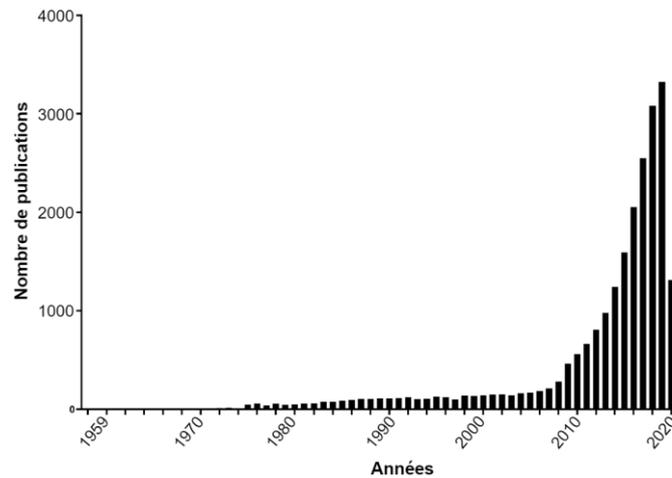


Figure 1.2 - Évolution du nombre de publications portant sur le domaine des EVs entre 1994 et 2017, d'après [29].

Du fait de leur taille hétérogène, de la difficulté à les détecter et à les caractériser par des méthodes conventionnelles, il n'existe pas de consensus permettant de classer les EVs. Toutefois, les EVs peuvent être nommées selon les cellules ou tissus dont elles sont originaires (par exemple dexosomes si elles proviennent des cellules dendriques ; prostasomes pour les vésicules dérivées de la prostate ; vésicules synaptiques issues des neurones). Aussi, des critères de taille, de densité, de morphologie, de composition protéique peuvent également entrer en jeu dans la classification des EVs, même si certains critères de classification se chevauchent et rendent leur distinction délicate.

La classification la plus commune (par la taille) sera exploitée dans ce manuscrit et permettra de distinguer les types de vésicules suivantes : les exosomes (Exo), les microvésicules (MVs) et les corps apoptotiques (non détaillé dans ce manuscrit).

1.1.a. Les exosomes

Johnstone et al. [30] a été le premier à isoler des exosomes à partir d'érythrocytes de mouton et à démontrer que ces vésicules comportaient un nombre important d'enzymes. Il a été admis, par la suite, que les exosomes transportaient également des protéines mais également des acides nucléiques comme l'ARNm et microARN (Valadi et al. dans les années 2000). De ce fait, les exosomes, définis il y a une quarantaine d'années déjà, sont toujours aujourd'hui au centre d'une recherche accrue.

Taille et densité :

Les exosomes sont présentes et sécrétées dans un grand nombre de fluides biologiques, corporels mais aussi dans des milieux de cultures. Leur diamètre se situe dans la limite basse

des EVs, entre 30 et 100 nm [26] et leur densité est comprise entre 1.13 et 1.19 g/mL [26]. Les méthodes standards de coloration négative permettent leur visualisation en microscopie électronique à transmission (TEM) et mettent en avant leur forme en « coupe » [31] [32] (Figure I.3).

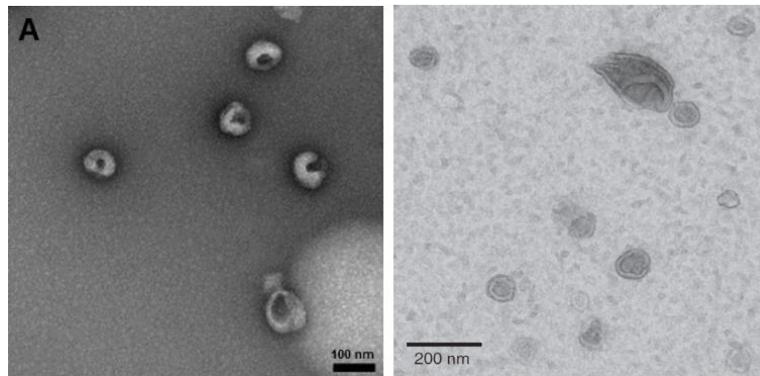


Figure I.3 - Différentes observations de la morphologie des exosomes au microscope électronique d'après [31] et [32], à partir d'échantillon sain.

Biogénèse :

Le mécanisme de formation des exosomes (Figure I.4), observé il y a plus de trente ans, reste à ce jour encore à l'étude. Une des voies de formation des exosomes, consiste en l'invagination de la membrane des endosomes et implique une première étape, la formation de vésicules intraluminales (ILV). Ces vésicules sont générées à l'intérieur d'endosomes multivésiculaires ou corps multivésiculaires (MVE). La fusion de la membrane des MVE avec la membrane plasmique d'une cellule permet la sécrétion et la libération des vésicules intraluminales ou exosomes vers l'extérieur de la cellule. Une seconde voie, plus directe, consiste en une libération des exosomes directement à partir de la membrane plasmique. La composition en protéines (plus de 4 000 protéines différentes ont été identifiées) [33], lipides et acides nucléiques caractérise les exosomes. Du fait de leur origine endosomale, tous les exosomes contiennent des protéines de transport, de fusion membranaire ou des protéines impliquées dans la formation et de la fusion de la membrane (GTPase, Alix, ...) ainsi que des lipides (cholestérol) ou des phospholipides... De plus, les exosomes contiennent en quantité importante des miARN, ARN non codant, mais également des ARNm. Cependant, il semble que le contenu de la cargaison d'ARN des exosomes puisse être similaire à celui provenant des cellules parentales. Ainsi, ces miARN pourraient être utilisés comme marqueurs fiables.

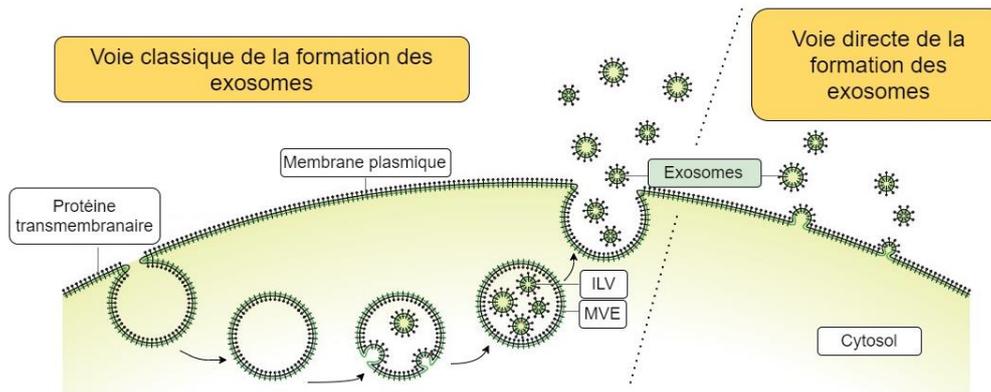


Figure I.4 - Schéma simplifié de la formation des exosomes. Formation dite « classique » : invagination de la membrane des endosomes, résultant en la formation de vésicules intraluminales (ILV), puis les endosomes deviennent des corps multivésiculaires (MVE) pouvant fusionner avec la membrane plasmique pour libérer des exosomes. Formation des exosomes par bourgeonnement direct de la membrane, d'après [26].

I.1.b. Les microvésicules

Les microvésicules ou microparticules, désignent des vésicules libérées par la membrane plasmique et regroupent l'ensemble des particules isolées dans des fluides biologiques.

Taille et morphologie :

Les microvésicules sont extrêmement hétérogènes en taille (de 100 à 1 000 nm de diamètre) et peuvent présenter un léger chevauchement de taille avec les exosomes. Les microvésicules présentent les mêmes caractéristiques morphologiques (Figure I.5) que les exosomes. Ainsi, leur observation au microscope électronique à balayage et à transmission suggère, également, une forme en coupe [34] [35] pour des échantillons issus de donneurs sains.

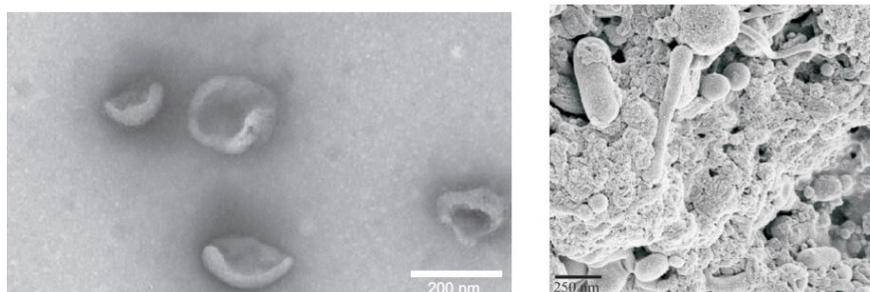


Figure I.5 - Différentes observations au microscope électronique de la morphologie des microvésicules ; à partir d'échantillon sain, d'après [34] et [35].

Biogénèse :

Comme les exosomes dérivés des corps multivésiculaires (MVE), les microvésicules peuvent directement bourgeonner à partir de la membrane plasmique et se libérer (Figure I.6), de façon similaire au processus de la biogénèse des exosomes. On peut ainsi très bien imaginer une microvésicule comme un compartiment délimité par une membrane, contenant des informations sur leur cellule d'origine.

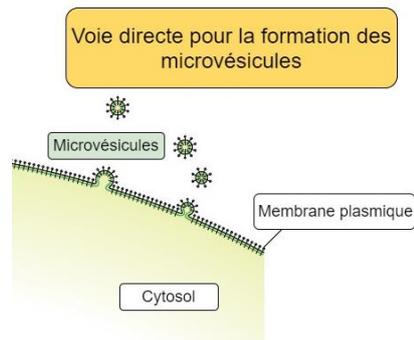


Figure I.6 - Schéma simplifié de la morphogénèse des microvésicules, bourgeonnement de la membrane plasmique, d'après [26].

I.2. Rôles biologiques et pathologiques des EVs

Les exosomes sont présents en grande quantité (environ $3 \cdot 10^6$ exosomes/mL de sérum [32]) dans les fluides biologiques, participent à la communication intercellulaire et entrent en jeu dans les processus physiologiques. Les exosomes peuvent alors avoir plusieurs rôles biologiques selon leur origine cellulaire.

Ainsi, la sécrétion des exosomes peut être vue comme un mécanisme de nettoyage des cellules permettant de se débarrasser de cargaisons non utiles. Cette sécrétion peut permettre la propagation d'agents pathogènes tels que des prions ou des virus dans l'organisme. Il a été démontré que les exosomes, peuvent déclencher des signalisations et délivrer une cargaison de miARN dans ces cellules. Grâce à cette interaction particulière et ciblée, les exosomes permettent de jouer un rôle de messenger entre les cellules distantes les unes des autres dans l'organisme. Dans le cas de pathologies, comme le cancer, les exosomes peuvent ainsi transmettre les oncogènes (secrétés par les cellules tumorales) à des cellules saines et ainsi engendrer le transfert de la maladie [36]. De par leur rôle de transporteur d'information et par leur capacité à transférer des messages à travers les membranes cellulaires d'une cellule à l'autre, il est possible d'imaginer le potentiel intéressant que peuvent avoir les exosomes d'un point de vue thérapeutique. En effet, les exosomes permettraient de cibler

spécifiquement des cellules et pourraient servir de traitement local sur ces cellules cibles, bloquant ainsi la migration et la prolifération des cellules tumorales. En connaissant la composition des différents fluides biologiques (en protéines, acides nucléiques, lipides, etc ...), les exosomes pourraient donc servir de biomarqueurs de nombreuses maladies et ainsi permettrait de surveiller de l'état de santé en fournissant des informations cliniques précoces d'un patient. Ils pourraient servir de diagnostic plus rapide et entrer en jeu dans des aspects thérapeutiques de nombreuses pathologies. Ainsi, un prélèvement de sang, de salive ou d'urine serait la meilleure alternative aux biopsies actuelles, invasives pour le patient [37].

Tout comme les exosomes, les microvésicules, après être libérées de leur cellule hôte et vont pouvoir se déplacer et transporter leur contenu à d'autres cellules distantes. Elles rentrent donc en jeu, tout comme les exosomes, dans la communication entre cellules. Des microvésicules isolées du sang ont permis de mettre en évidence le rôle des microvésicules dans diverses pathologie (cardiovasculaire, cancer, ...)

I.3. Récapitulatif des différentes classes d'EVs

EVs	DIAMETRE	MORPHOLOGIE	ORIGINE
EXOSOMES	30 à 100 nm	En forme de tasse	Libération lors de la fusion de la membrane plasmique
MICROPARTICULES	100 à 1 000 nm		Bourgeonnement de la membrane plasmique

Tableau I.1 - Tableau synthèse sur les différentes classes d'EVs (définition de leur taille, morphologie et origine).

Une société internationale regroupant plus de 700 membres a été créé « Société Internationale des EVs (ISEV) » [38] dans le but de diffuser les connaissances, contribuer à la compréhension et à la recherche, générer un intérêt de la part du grand public pour les EVs.

II. Les techniques de purification et d'isolement des EVs

Comme déjà présenté précédemment, les EVs sont contenues dans les fluides biologiques [39] et les liquides complexes contenant d'autres espèces moléculaires et cellulaires (cellules, débris membranaires, protéines, etc...). Il est donc délicat, dans ces milieux (Figure I.7), de les distinguer de façon exacte.

Ainsi pour remédier à ce problème, il existe à ce jour différentes méthodes permettant de purifier [40] [41] [42] [43] et d'isoler les EVs à partir de ces liquides. Dans cette partie, nous nous contenterons de rappeler les méthodes les plus couramment utilisées.

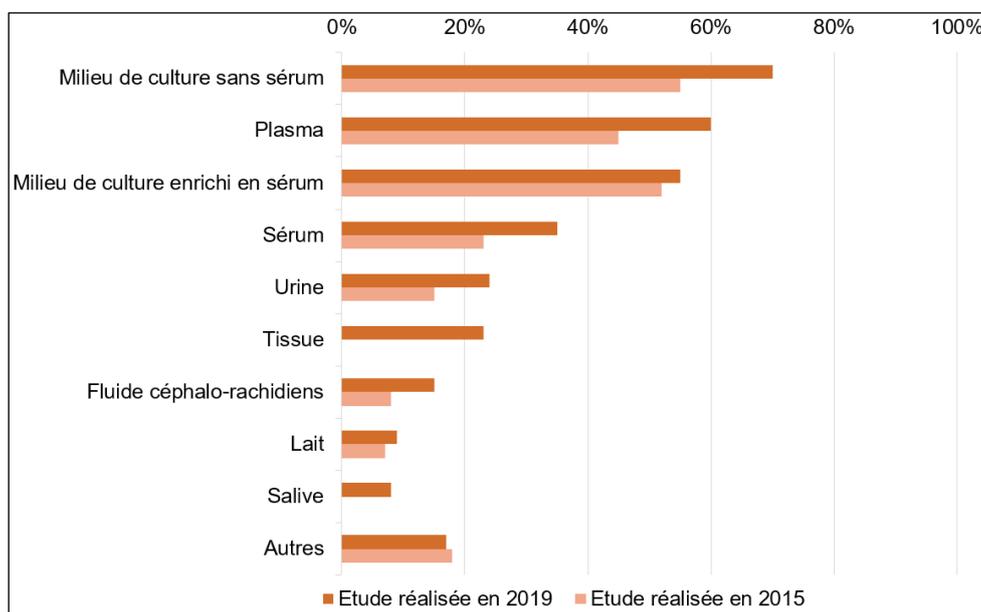


Figure I.7 – Études comparatives, réalisées en 2015 et 2019, portant sur les différents fluides biologiques à partir desquels les EVs peuvent être purifiés. Résultats obtenus à partir de 357 réponses d'après les sondages réalisés par Gardiner et al. (Possibilité de réponse multiple).

II.1. Méthode de purification par la taille

II.1.a. Chromatographie d'exclusion par la taille (SEC)

La chromatographie d'exclusion par la taille ou Size Exclusion Chromatography (SEC) est une technique utilisée dès 2014 [44] permettant l'isolement des EVs à partir de biofluides. Le principe de la chromatographie d'exclusion par la taille [45] [46] [47] est basé sur la séparation des particules en solution selon leur rayon hydrodynamique. En transportant l'échantillon à travers une colonne remplie d'un matériau poreux (souvent à base de polymère ou de silice) il est possible de séparer les particules selon leur profil d'élution. De ce fait, les petites molécules seront ralenties en entrant dans les pores du polymère tandis que les plus grosses, c'est-à-dire celles possédant une taille supérieure aux pores du polymère, circuleront plus rapidement dans la colonne et par conséquent, seront éluées plus rapidement. Ainsi, il existe plusieurs kits commerciaux utilisant cette approche (qEV chez Izon Science [48], Omnisec chez Malvern Panalytical [49], etc...). De plus, cette technique peut être utilisée en complément d'autres méthodes de purification (ultracentrifugation par exemple).

Les kits commerciaux de chromatographie d'exclusion par la taille ont pour avantages de préserver la structure et l'intégrité biologique de l'échantillon. Sa mise en œuvre est simple et rapide d'utilisation (quelques minutes) comparée à d'autres techniques de purification et ne nécessite qu'un faible volume initial d'échantillon (compris entre 150 μ L et 10 mL). Cependant, des étapes de prétraitement doivent être réalisées avant l'analyse afin d'éviter d'éventuels bouchages des pores durant le processus de purification.

II.1.b. Fractionnement par écoulement de champ (FFF)

Le fractionnement par écoulement de champ ou Flow Field-Flow Fractionation (FFFF) [50] [51] est une technique permettant d'isoler les vésicules et les exosomes selon leur taille. Pour ce faire, un échantillon, dans lequel les vésicules à séparer sont en suspension, est injecté dans une chambre contenant une membrane semi-perméable. Cet échantillon est soumis ensuite à un flux parabolique. Un champ externe (par exemple une force élastique, un gradient thermique, etc...), transversal à l'écoulement, est appliqué dans cette chambre, conduisant ainsi à l'isolement des vésicules selon leur taille (Figure I.8). Les grosses particules, affectées par l'écoulement perpendiculaire, seront repoussées vers les parois de la chambre où la vitesse d'écoulement est la plus faible. Les vésicules les plus petites, resteront, elles, au centre du flux et seront éluées plus rapidement. L'écoulement asymétrique FFF (AF4) [52] [53] est souvent utilisé pour fractionner les exosomes à partir d'un milieu de culture ou dans les fluides biologiques.

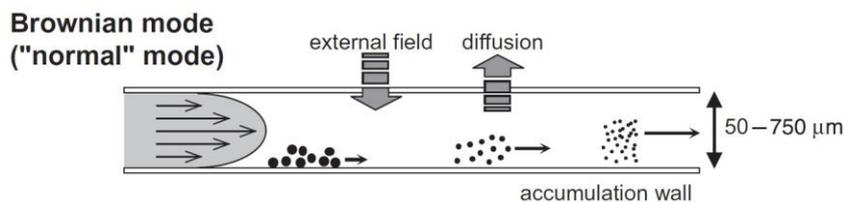


Figure I.8 - Principe de fractionnement des particules par la taille par la méthode de fractionnement par écoulement de champ.

Cette technique est cependant rarement mise en œuvre dans les laboratoires de biologie du fait des multiples d'instruments nécessaires (application de champs externes) et de leur optimisation complexe.

II.1.c. Filtration et ultrafiltration

Une autre technique, utilisant la taille des objets pour séparer les EVs à partir d'un milieu biologique, est la filtration et l'ultrafiltration [54] [55]. Cette technique se réalise à l'aide d'une membrane semi-perméable adaptée. Il s'agit d'une méthode de séparation rapide et facile

d'utilisation et non limitée par le volume d'échantillon. Nordin et al. [56] proposent une filtration en plusieurs étapes, en utilisant des filtres de tailles différentes comme indiqué en Figure I.9.

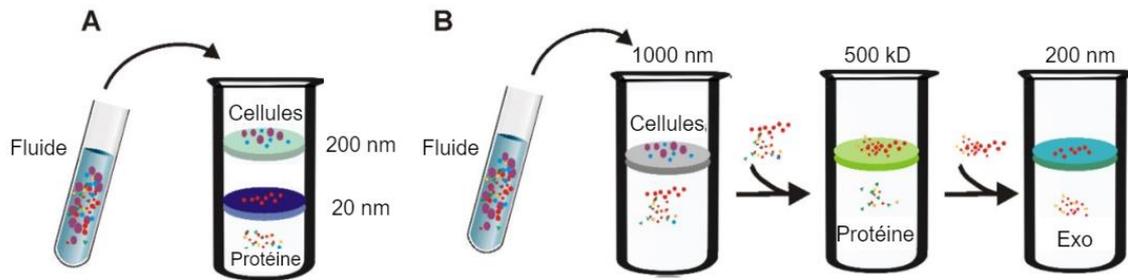


Figure I.9 - Schéma explicatif de l'ultrafiltration permettant la séparation des exosomes. A) Microfiltre « en tandem » avec des limites d'exclusion entre 20 et 200 nm. B) Ultrafiltration séquentielle. Le premier filtre permet d'éliminer les grosses particules, puis le filtrat passe au travers d'un second filtre pour éliminer les protéines. Le troisième filtre permet la récupération des exosomes inférieures à 200 nm.

Cependant, la filtration, ne permet pas le fractionnement des différentes vésicules, peut engendrer un colmatage ou un piégeage et même provoquer une déformation des vésicules au travers des filtres. De ce fait, l'ultrafiltration est souvent couplée à d'autres techniques [57] de purification comme l'ultracentrifugation ou la SEC.

II.2. Ultracentrifugation

La technique de purification actuellement la plus utilisée pour isoler les EVs est l'ultracentrifugation. Avant 2015 [58], 90 % des études portant sur l'isolement des vésicules impliquait cette méthode de séparation. Cette technique, repose sur le principe de la densité des particules. En effet, les espèces les plus denses (comme les cellules, débris cellulaires, etc...) seront isolées en premier en appliquant des forces de centrifugation [59] adéquates. Ces forces sont dépendantes de (1) la vitesse de rotation, (2) du type de rotor [60] (godets oscillants ou à angle fixe) et (3) de la viscosité du milieu (elle-même dépendante de la température, par exemple à 20°C, le plasma est plus visqueux que le sérum et le milieu de culture [61]).

Plusieurs étapes de centrifugation [62] (dans ce cas, il s'agit de centrifugation différentielle) sont nécessaires pour séparer les EVs à partir d'un milieu complexe (Figure I.10). Aussi, trois premières ultracentrifugations permettent d'éliminer les grosses particules (cellules, débris cellulaires, etc...) se trouvant dans la partie inférieure (culots) en gardant les surnageants. Enfin, les deux dernières étapes permettent de purifier [63] l'échantillon en exosomes, en récupérant cette fois-ci le culot.

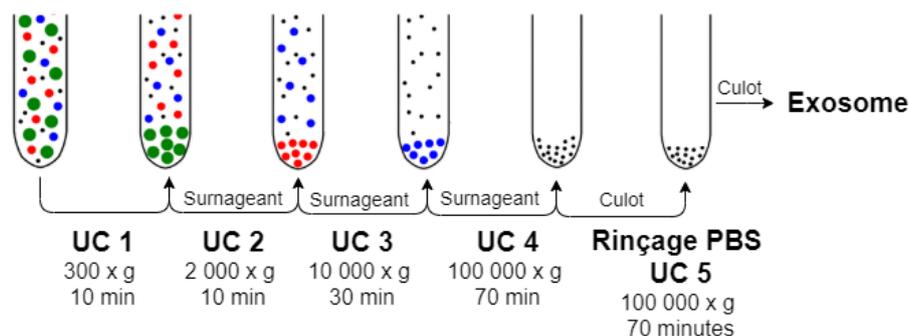


Figure I.10 - Procédure de purification des exosomes par des étapes d'ultracentrifugation (UC) d'après [63]. La première centrifugation permet l'élimination des cellules. En récupérant le surnageant une seconde étape permet d'éliminer les débris cellulaires. Le nouveau surnageant est passé de nouveau pour récupérer les pellets d'EVs. Les dernières étapes de centrifugation permettent de purifier l'échantillon en EVs ou petits EVs.

Même si l'ultracentrifugation reste aujourd'hui encore l'une des méthodes les plus utilisées et si elle ne nécessite que très peu de réactifs supplémentaires (peu ou pas de prétraitement avant d'effectuer une ultracentrifugation) et ne demande que peu d'expertise, celle-ci comporte néanmoins quelques inconvénients comme (1) un grand volume nécessaire (jusqu'à 1 mL), (2) un temps de séparation long et (3) un équipement coûteux. De plus, il a été observé que les vésicules isolées par ultracentrifugation posséderaient une gamme de taille pouvant être hétérogène, ceci pouvant être lié à l'agrégation ou à la déformation des vésicules (ou même à la lyse des exosomes) en raison des forces de cisaillement durant la centrifugation.

II.3. Précipitation

La purification des EVs peut également être réalisée par précipitation [64], c'est-à-dire en fonction de la solubilité des particules, en introduisant un polymère (souvent du PEG PolyEthylène Glycol) dans l'échantillon. Du fait de ces propriétés hydrosolubles, l'utilisation du PEG augmente le nombre d'interactions hydrophobes et contraint les particules les moins solubles à s'éloigner, engendrant ainsi leur précipitation. Cependant, une étape de centrifugation peut être nécessaire pour permettre de séparer correctement les vésicules. Pour effectuer la purification des EVs à partir de fluide, il existe aujourd'hui de nombreux kits commerciaux [65] (ExoQuick [66] de System Biosciences, Total Exosome Isolation Kit de chez ThermoFischer, etc...). Cette technique de précipitation des EVs possède plusieurs avantages, tels que (1) sa simplicité d'utilisation et (2) son volume initial assez large, compris entre 100 μ L et 1 mL. Néanmoins, il s'agit d'une technique non spécifique, c'est-à-dire que la précipitation des vésicules inclut la précipitation de molécules comme des protéines

extracellulaires ou des agrégats de cellules. Aussi, elle nécessite potentiellement un second traitement en amont (ultracentrifugation ou filtration par exemple) pouvant dénaturer les vésicules d'intérêts. Cette technique peut donc demander un certain temps de préparation et de réalisation.

II.4. Les méthodes d'immunocapture

Cette technique de séparation des vésicules par immunoaffinité repose sur l'utilisation d'anticorps correspondant aux antigènes présents à la surface de celles-ci et fonctionnant comme des marqueurs spécifiques de l'isolement [67]. La présence de nombreuses protéines et de récepteurs membranaires permet un large potentiel de développement de ces techniques de séparation, pour les exosomes, par interactions entre protéines (antigènes) et anticorps correspondants. Un test immuno-enzymatique ELISA [68] a été développé pour capturer et quantifier [69] des exosomes à partir de fluides biologiques (plasma ou urine). Une application de dispositif d'immunocapture sera donnée dans le chapitre IV. L'atout majeur de cette technique est la séparation spécifique des sous-espèces à partir d'un milieu complexe, ceci conduisant à une forte pureté en vésicules après la capture. Cependant, cette séparation n'est possible que dans les cas où les couples protéines/antigènes sont exprimées à la surface des vésicules et dépend, ainsi, grandement des anticorps choisis. De ce fait, cette technique possède un rendement plus faible que les autres techniques de purification et peut être perturbée par des interactions non spécifiques. Il peut alors être nécessaire d'utiliser d'autres techniques de purification avant cette technique de capture.

Toutefois, dans le cas des techniques de capture par billes magnétiques ou magnéto-capture, les anticorps, contre les antigènes d'intérêts, sont fixés à la surface de billes magnétiques. En utilisant ces billes, l'efficacité de capture est augmentée du fait de la surface de capture plus importante et permet ainsi une visualisation des vésicules plus aisée.

II.5. Les dispositifs microfluidiques

La microfluidique est un domaine en expansion depuis plusieurs années, presque 226 000 publications entre 2012 et 2021 (source Google Scholar), que ce soit dans les domaines [70] de l'ingénierie, la médecine ou encore la biologie. Les avantages d'utiliser des dispositifs microfluidiques sont la réduction (1) de la consommation d'échantillon et (2) du temps de réaction, notamment en raison de la faible dimension des canaux ou des chambres de réaction. Le domaine du tri cellulaire fait partie des domaines qu'exploite la microfluidique (on compte environ 18 000 publications entre 2012 et 2021, source Google Scholar). Il intervient souvent dans la préparation d'échantillon dans le but d'établir un diagnostic. Il existe différentes techniques de tri en microfluidique que l'on peut classer en deux catégories : les

techniques actives et les techniques passives. Les techniques dites actives ont l'obligation d'utiliser un champ extérieur pour fonctionner (par exemple magnétique, optique, acoustique, mécanique, etc...). Les techniques passives, comme leur nom l'indique, n'ont, elles, pas besoin de champ supplémentaire et utilisent la taille, la forme ou les propriétés mécaniques ou chimiques de l'échantillon pour établir la séparation. Il en existe plusieurs types : la filtration physique, le déplacement latéral déterministe, etc...

II.5.a. L'acousto-fluidique

Les méthodes d'acousto-fluidique [71] [72] [73], comme leur nom l'indique, utilisent des ondes acoustiques pour fractionner des particules selon leur taille. En effet, en appliquant un champ acoustique adapté, souvent généré à l'aide de matériaux piézoélectriques, il est possible d'isoler des particules avec précision (Figure I.11). Cette technique possède plusieurs avantages (1) traitement d'une large gamme de volume (du nano au millimètre), (2) biocompatibilité (fluide natif), (3) simple de conception et (4) facilement intégrable avec d'autres dispositifs microfluidiques.

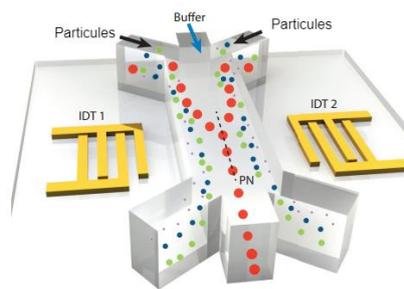


Figure I.11 - Exemple de séparation par champ acoustique d'après [72]. Deux transducteurs (IDTs) génèrent des champs d'onde acoustique stationnaire. Un mélange de particules (10, 8,5 et 1 μm) est injecté dans le dispositif et est soumis aux forces acoustiques. Les grosses particules (10 et 8 μm) subissent des forces plus importantes que les petites (5 et 1 μm) et sont attirées plus rapidement vers le nœud de pression (PN) et sortent par le canal de sortie centrale, tandis que les autres particules se dirigent vers les sorties latérales.

Récemment, une plateforme acousto-fluidique [74] a été mise en place dans le but de séparer des exosomes à partir de sang complet. Pour cela, deux modules sont nécessaires : un premier éliminant les composants sanguins et un second permettant la séparation des EVs. Cependant, ce type de séparation, courante pour les cellules et pour les particules, reste aujourd'hui peu utilisé pour les exosomes et nécessite, dans la plupart des cas, une étape de préparation (ultracentrifugation, par exemple).

II.5.b. Déplacement latéral déterministe (DLD)

La technique de déplacement latéral déterministe, mise en œuvre en 2004 [75], permet la séparation des EVs [76] sur la base de leur taille avec une résolution allant jusqu'à 10 nm. Il s'agit d'une technique de séparation passive, sans marquage et particulièrement adaptée aux particules de tailles micro et nanométriques. La structure générale d'un dispositif DLD se compose d'un canal microfluidique dans lequel un réseau de piliers, disposés régulièrement, permet d'orienter le chemin du fluide. La trajectoire (Figure I.12) des particules injectées [77] dans le dispositif sera influencée par leur taille, c'est-à-dire, que des particules de grande taille, supérieure à un rayon de coupure, seront déviées le long des rangées de piliers, tandis que les plus petites (de taille inférieure au rayon de coupure) resteront dans l'axe du canal microfluidique. Ainsi, il est possible de récolter, aux sorties appropriées, les deux populations de particules [78].

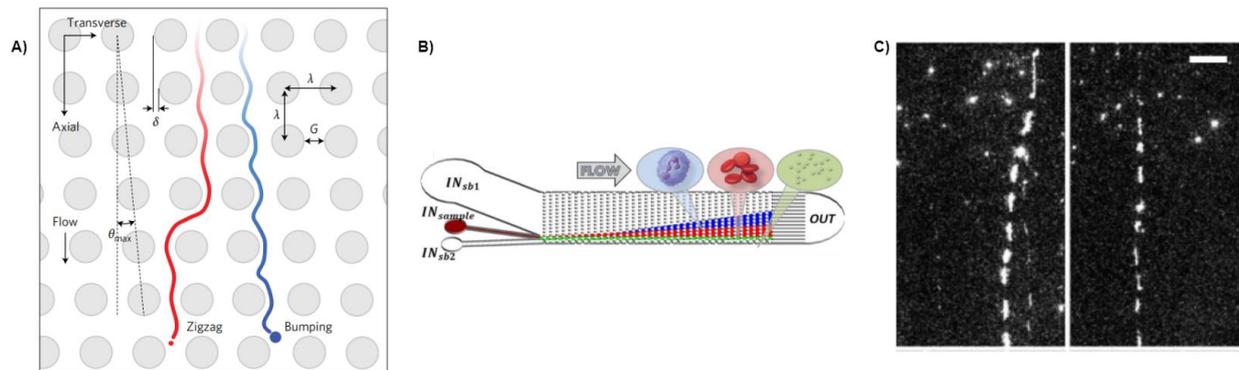


Figure I.12 - Principe de la DLD d'après [77] et [78]. A) Schématisation du principe de fonctionnement, les petites particules de taille inférieure au rayon de coupure circuleront en « zigzag » tandis que les grosses particules se déplaceront en mode « choc ». B) Exemple de géométrie appliquant le principe DLD, permettant la séparation des microvésicules en vert des cellules en rouge. C) Exemple de microscopie à fluorescence montrant la séparation des exosomes à travers de pilier (échelle : 10 μm).

En effet, les particules de taille inférieure au rayon de coupure, en suivant les lignes de courant, traverseront les différents obstacles et auront un mouvement en zigzag, tandis que les plus grosses, seront déviées selon un angle de migration et se déplaceront en mode « de choc ».

Afin d'obtenir une plus large gamme d'application, les caractéristiques géométriques peuvent être adaptées mais également être couplées à des forces externes (par exemple acoustique [79], électrique [80], gravitationnelle [81], etc. ...) permettant ainsi la séparation selon d'autres critères différents de la taille (propriété de forme, déformabilité, électrique, etc. ...).

Cependant, l'inconvénient majeur de la DLD est le risque de bouchage des réseaux, notamment lors de l'utilisation de sang par exemple.

II.6. Récapitulatif des différentes techniques de purification des EVs

METHODE DE PURIFICATION	PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT	AVANTAGES	INCONVENIENTS
<p>CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION PAR LA TAILLE (SEC)</p> <p>[29], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [54], [56], [62], [104], [105]</p>	<p>Rayon hydrodynamique</p> <p><i>(Isolement des EVs, en fonction de la taille, par l'utilisation d'une phase stationnaire poreuse)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Rapide d'utilisation (environ 1 mL/min) dans le cas des kits commerciaux -Large gamme d'échantillon à analyser (15 µL à 10 mL) -Structure et intégrité des EVs préservées -Pas d'utilisation de produit chimique supplémentaire (hors équipements) - Reproductibilité 	<ul style="list-style-type: none"> -Achat d'équipements et de consommables (qEV chez Izon Sciences, Omnisec chez Malvern Panalytical) -Étape de purification en amont conseillée (ultracentrifugation, filtration) -Risque de détériorations des équipements de type bouchon si aucun traitement n'est appliqué en amont
<p>FRACTIONNEMENT PAR ECOULEMENT DE CHAMP (FFFF)</p> <p>[29], [50], [51], [52], [53], [54], [56], [62], [104], [105]</p>	<p>Rayon hydrodynamique et mobilité électrophorétique</p> <p><i>(Isolement des EVs, en fonction de la taille, soumis à un flux parabolique)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Plusieurs critères d'identification (taille, poids moléculaires, ...) possible des EVs -Structure des EVs préservée 	<ul style="list-style-type: none"> -Achat d'équipement spécialisé -Mise en œuvre délicate et demande de qualification -Utilisation de champ externe (thermique, électrique, électrostatique, ...) -Dépendant des paramètres (flux, champ externe) -Étape de purification (ultracentrifugation, filtration) en amont conseillée

<p style="text-align: center;">ULTRAFILTRATION</p> <p>[29], [54], [55], [56], [57], [62], [104], [105]</p>	<p style="text-align: center;">Rayon hydrodynamique</p> <p style="text-align: center;"><i>(Isolement des EVs, en fonction de la taille, par l'utilisation de nanomembrane)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Simple d'utilisation -Procédure rapide (quelques minutes) -Volume à analyser non limitant (à partir de 0,5 mL) 	<ul style="list-style-type: none"> -Dépendant des équipements (filtres) -Faible durée de vie des équipements -Nécessité d'une étape de prétraitement (SEC, ultracentrifugation, etc...) en amont -Risque de détériorations (colmatage et piégeage) des équipements -Possible perte d'information (fixation des EVs sur les filtres) -Risque de déformation des EVs (contraintes de cisaillement appliquées)
<p style="text-align: center;">ULTRACENTRIFUGATION</p> <p>[29], [54], [56], [58], [59], [60], [61], [62], [63], [104], [105]</p>	<p style="text-align: center;">Densité</p> <p style="text-align: center;"><i>(Isolement des EVs en fonction de leur densité de flottaison)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Méthode de purification couramment utilisée (90 % des études appliquent des étapes d'ultracentrifugation) -Méthode robuste -Facile d'utilisation et nécessitant peu d'expertise -Identification des sous-populations d'EVs (dans le cas d'une centrifugation avec un gradient de densité) -Réduction des risques de contamination par des réactifs (pas de produit chimique utilisé) 	<ul style="list-style-type: none"> -Achat d'équipement spécialisé -Équipement non mobile -Mise en œuvre longue (> 2 heures pour la purification des exosomes) -Nécessité d'appliquer plusieurs étapes successives d'ultracentrifugation -Ne convient pas au diagnostic de petit volume (> 1 mL) -Risque de détérioration (sédimentation, agglomération, déformation ou lyse) de la solution à purifier

		<ul style="list-style-type: none"> -Purification à partir de biofluides (sang, plasma sanguin, ...) 	<ul style="list-style-type: none"> -Exploitation non totale de l'échantillon à purifier (récupération du culot ou du surnageant seulement) -Dépendant du type de matériel biologique, du choix des rotors, du temps de centrifugation, de l'accélération, ...
<p>PRECIPITATION</p> <p>[29], [54], [56], [62], [64], [65], [66], [104], [105]</p>	<p>Solubilité</p> <p><i>(Isolement par utilisation de polymère modifiant la solubilité des EVs)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Méthode simple d'utilisation -Large gamme d'échantillon (100 µL à 1 mL) -Traitement d'un grand nombre d'échantillon en parallèle possible -Intégrité des EVs préservée 	<ul style="list-style-type: none"> -Achat d'équipement spécialisé (ExoQuick de System Biosciences, Total Exosome Isolation Kit chez ThermoFischer) -Utilisation du PEG (assez difficile de séparer le polymère des EVs) -Existence de contaminant, impuretés protéiques, etc... -Nécessité d'appliquer d'autres étapes de purification (ultracentrifugation ou filtration) en amont -Possible étape de purification après l'étape de précipitation -Mise en œuvre longue (40 minutes à plus d'une heure) -Interprétations des résultats délicates -Mauvaise reproductibilité
<p>IMMUNOCAPTURE</p>	<p>Marqueur de surface</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Technique hautement spécifique (interactions spécifiques récepteur-ligand) 	<ul style="list-style-type: none"> -Dépendant de la spécificité des marqueurs présents en surface de la membrane

<p>[29], [54], [56], [62], [67], [68], [69], [104], [105]</p>	<p><i>(Isolement par une approche d'immunoaffinité anticorps-antigène présent en surface des EVs)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Méthode adaptée à l'isolement des sous-population d'EVs -Combinaison avec d'autres techniques de caractérisation (DLS, cytométrie en flux) 	<ul style="list-style-type: none"> -Mise en œuvre longue (> 1 heure) -Nécessité d'une première étape de purification (ultracentrifugation, filtration) en amont -Interprétation des résultats délicates (possible interaction non spécifique) -Dénaturation des EVs après capture (difficultés de détacher les anticorps) -Coût des réactifs
<p>METHODES MICROFLUIDIQUES</p> <p>[29], [54], [56], [62], [70], [71], [72], [73], [74], [75], [76], [77], [78], [79], [81], [104], [105]</p>	<p>Taille, déformabilité</p> <p><i>(Isolement à l'échelle microscopique et basé sur différentes propriétés des EVs)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Réduction considérable des consommables (1-14 µL/min) -Réduction du temps de manipulation (< 1 heure) -Structure des EVs préservée -Facilement intégrable à d'autres techniques de purification (immunocapture) sur une seule puce -Dispositifs mobiles -Purification à partir à partir de biofluides (sang, plasma sanguin, ...) 	<ul style="list-style-type: none"> -Manque de standardisation -Manque de validation des méthodes -Nécessite un niveau d'expertise dans la mise en place et la fabrication des dispositifs

Tableau I.2 - Description de différentes techniques de purification appliquées aux EVs (principe de fonctionnement, avantages et inconvénients).

Aujourd'hui, la méthode de purification des EVs la plus utilisée reste de loin l'ultracentrifugation (Figure I.13A). Toutefois, il est à noter qu'elle est très peu adaptée pour de faibles volumes initiaux à analyser (Figure I.13B) [82].

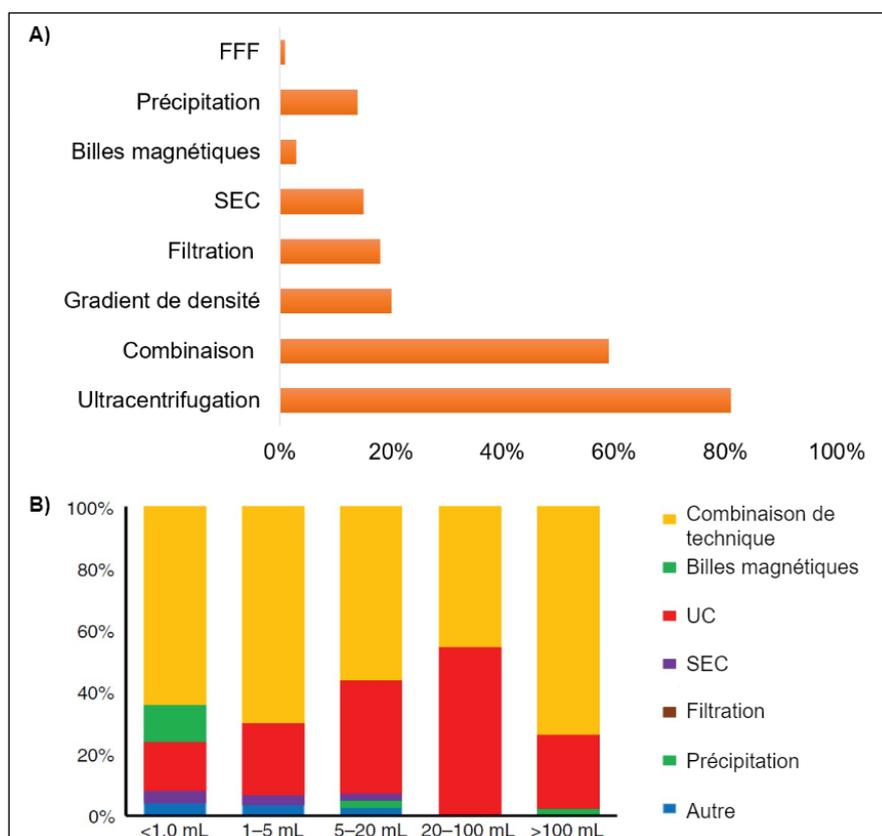


Figure I.13 – Enquête envoyée aux membres de l'ISEV portant sur les différentes pratiques mondiales des études des EVs d'après [42] et réalisée en 2016 à partir d'un questionnaire avec possibilité de réponse multiple. Ce questionnaire porte sur des questions A) du choix de méthode de purification utilisée ou B) des volumes initiaux à analyser.

III. Motivations et objectifs de la thèse

Les EVs sont des sous-espèces, de tailles nanométriques et hétérogènes, libérées par toutes les cellules de l'organisme. Elles circulent librement dans les fluides biologiques et sont aujourd'hui considérées comme de potentiels marqueurs et indicateurs de nombreuses maladies. Ainsi, les identifier et les caractériser reste un défi majeur qui pourrait conduire à des diagnostics et pronostics rapides de nombreuses pathologies. Cependant, de par leur taille hétérogène, aucune technique actuelle ne permet de bien les quantifier et les caractériser. Ainsi, seule une combinaison de technologies pourrait permettre de fournir des informations importantes sur ces espèces d'intérêts. Dans ce but, le projet ANR MADNESS (Microfluidic Approach for Deciphering Nanoscale biovesicLES propertieS) a pour objectif de

développer une plateforme miniaturisée qui permettrait d'isoler, de fractionner et de classifier les EVs à partir d'un fluide biologique. Le projet MADNESS implique donc l'expertise de deux laboratoires, le LAAS-CNRS pour la partie microfluidique et FEMTO-ST pour la partie bioanalytique.

Dans ce contexte, le rôle du LAAS-CNRS est de développer un module microfluidique capable d'isoler les EVs à partir d'un échantillon biologique complexe comme le sang complet ou le plasma sanguin.

Un second dispositif, développé en parallèle à Besançon par le partenaire FEMTO-ST, permettra d'effectuer une immunocapture multiple des EVs isolées et d'analyser les sous-espèces piégées à l'aide d'une instrumentation AFM.

Ainsi, ces approches multiparamétriques et multifonctionnelles conduiront à la conception d'un instrument générique permettant la qualification des nanoparticules et au développement d'une nouvelle gamme de test de diagnostic et de pronostic. Cette plateforme présentera plusieurs avantages. Tout d'abord, la possibilité de travailler sur des échantillons de sang complet, n'ayant subi aucun prétraitement. L'analyse d'échantillon de petit volume (à terme, utilisation de volume inférieur à 100 μL) est réalisable. Enfin, cette plateforme permettra l'exploration des sous-populations vésiculaires.

L'objectif de cette thèse, dans ce contexte, est donc de développer un laboratoire sur puce d'isolement de particules submicrométriques, compatible avec le module d'immunocapture développé à FEMTO-ST. De nombreuses contraintes doivent ainsi être prises en comptes :

- La séparation à partir d'un échantillon complexe
- Le dispositif doit être jetable pour éviter les contaminations entre les analyses
- Le volume filtré minimal doit être de l'ordre de 30 μL
- Le temps de filtration ne doit pas dépasser une heure

Compte tenu de ces exigences et de l'état de l'art qui précède, nous orientons notre choix vers une méthode de séparation passive, impliquant donc une structuration simplifiée et des dispositifs peu coûteux à la réalisation. Nous avons choisi de privilégier une méthode par filtration hydrodynamique.

**CHAPITRE II : PRINCIPE DE LA FILTRATION
HYDRODYNAMIQUE ET TECHNOLOGIES DE
FABRICATION DES DISPOSITIFS**

Dans ce chapitre, nous nous consacrerons à la présentation des fondements théoriques de l'approche retenue et de la démarche de conception et de réalisation des laboratoires sur puce (LOC) de séparation. Nous décrivons dans un premier temps le principe de séparation selon la taille qui nous permettra de récolter les EVs à l'aide de nos dispositifs. Pour cela, nous avons choisi d'appliquer le principe de la filtration hydrodynamique. Puis, nous détaillerons l'ensemble des géométries que nous avons choisi d'étudier pour nos dispositifs possédant 1, 10 et 100 canalisations secondaires. Enfin, nous présenterons les deux technologies de fabrication, à l'aide de films secs photosensibles ou par PDMS, mis en œuvre pour la réalisation de l'ensemble des puces fluidiques.

I. Principe du dispositif de tri

I.1. Principe de la filtration hydrodynamique

La filtration hydrodynamique a été introduite en 2005 par Yamada et Seki [83]. Son but est de séparer des particules selon une taille définie. Cette technique, passive, utilise le principe illustré sur la Figure II.1. Pour cela, une canalisation principale est connectée à une ou plusieurs canalisations secondaires. Le flux étant laminaire, le débit de fluide qui va être dévié dans la (ou les) canalisation(s) secondaire(s) définit une ligne séparatrice. La distance entre cette ligne et la paroi de la canalisation principale définira ce que l'on va nommer le rayon de coupure (noté R_c , en rouge sur la Figure 1). Ainsi, les particules dont leur centre se situe entre cette séparatrice et la paroi de la canalisation principale, c'est-à-dire dont leur rayon est inférieur au rayon de coupure R_c , seront déviées dans les canalisations secondaires. Il est alors possible de récupérer dans la partie « solution filtrée », une partie de liquide correspondant à l'écoulement présent entre le bord de la canalisation principale et le centre de la particule. Toutefois, les particules de plus grosse taille et possédant un rayon supérieur au rayon de coupure R_c , resteront, elles, dans la canalisation principale et seront récoltées dans la partie dite « non filtrée ».

La position de la ligne séparatrice par rapport à la paroi, est définie par le rapport des débits entre la canalisation principale (noté Q_{IN}) et les canalisations secondaires (noté Q_{LAT}). Les débits, dans les différentes canalisations, étant fonction de leur résistance hydrodynamique, il est donc possible, en choisissant des dimensions appropriées pour les différentes canalisations, de concevoir un dispositif microfluidique présentant une fonction séparatrice à un rayon de coupure R_c donné.

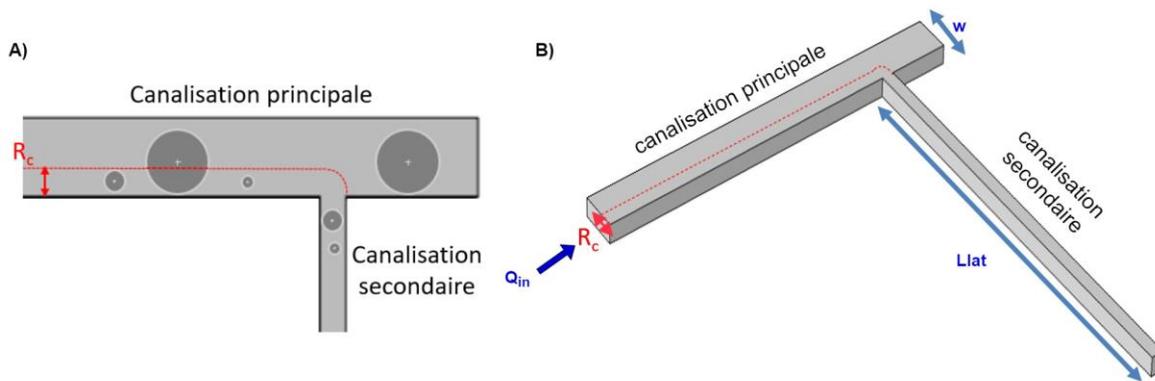


Figure II.1 - Schéma de principe de la filtration hydrodynamique. A) Schéma représentant la canalisation principale, secondaire et la ligne séparatrice en rouge pointillée. B) Vue en perspective de la canalisation principale et secondaire et débits des différentes canalisations.

Cette technique présente un avantage essentiel par rapport aux autres techniques de filtration : elle n'est pas sujette au colmatage. En effet, les dimensions minimales des canalisations peuvent être très supérieures à la taille de tri fixée. Elle est donc une des rares techniques permettant de travailler directement avec des échantillons denses et complexes comme le sang complet.

Nous allons déterminer les différents paramètres du flux dans un canal de section rectangulaire. Nous notons respectivement w , h et L la largeur, la hauteur et la longueur du canal avec Δp la différence de pression appliquée, μ la viscosité dynamique. Nous émettons les hypothèses suivantes :

- Écoulement stationnaire et unidirectionnel (régime permanent)
- Fluide Newtonien incompressible (suivant l'axe x)
- Différence de pression appliquée de façon constante (selon x)
- Régime à faible vitesse
- Vitesse nulle aux parois (conditions aux limites)

En considérant ces hypothèses et en se positionnant dans le cas d'un écoulement de Poiseuille, l'équation de Navier-Stokes peut être simplifiée par :

$$\nabla p = \mu \cdot \Delta v_x \cdot \vec{e}_x \quad (\text{II.1})$$

Puis en appliquant les conditions aux limites, la solution en coordonnées cartésiennes devient

$$\frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x(y, z)}{\partial z^2} = -\frac{\nabla p}{\mu} \quad (\text{II. 2})$$

Or, cette équation n'admet pas de solution analytique. Afin de parvenir à une solution, il est utile de passer en développement de Fourier. Il est possible alors d'obtenir l'expression du profil de vitesse résolu pour un écoulement unidimensionnel d'un liquide Newtonien incompressible comme il a été démontré par Fouet et al. [84].

$$v_x(y, z) = \frac{4 \cdot h^2 \cdot \Delta p}{\pi^3 \cdot \mu \cdot L} \sum_{n=\text{imp}}^{+\infty} \frac{1}{n^3} \cdot \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot y}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot w}{2 \cdot h}\right)} \right] \cdot \sin\left(\frac{n \cdot \pi \cdot z}{h}\right) \quad (\text{II. 3})$$

Le débit peut alors être obtenu en intégrant l'expression du profil de vitesse (II-3) selon les sections appropriées.

- Débit dans la canalisation principale Q_{IN} :

Pour obtenir le débit dans la canalisation principale, le profil de vitesse (II-3) est intégré sur la section droite du canal, soit :

$$Q_{in} = \int_{y=-\frac{w}{2}}^{\frac{w}{2}} \int_{z=0}^h v_x(y, z) dy \cdot dz \quad (\text{II. 4})$$

Le débit dans la canalisation principale est alors :

$$Q_{in} = \frac{h^3 \cdot w \cdot \Delta p}{12 \cdot \mu \cdot L_{in}} \cdot \left[1 - \sum_{n=\text{imp}}^{\infty} \frac{192 \cdot h}{(n \cdot \pi)^5 \cdot w} \cdot \tanh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot w}{2 \cdot h}\right) \right] \quad (\text{II. 5})$$

- Débit de la canalisation secondaire Q_{LAT} :

Pour obtenir le débit dans la canalisation secondaire, le profil de vitesse (II-3) est intégré sur la section comprise entre la ligne séparatrice et la paroi de la canalisation, soit :

$$Q_{Lat} = \int_{y=-\frac{w}{2}}^{-\frac{w}{2}+R_c} \int_{z=0}^h v_x(y, z) dy \cdot dz \quad (\text{II. 6})$$

Le débit dans la canalisation secondaire peut alors être défini comme suit :

$$Q_{Lat}(R_c) = \frac{h^3 w \Delta p R_c}{24 \mu L w} \cdot \left[1 - \sum_{n=\text{imp}}^{\infty} \frac{96h}{(n\pi)^5 R_c} \cdot \left(\tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \cdot \left(1 - \cosh\left(\frac{n\pi R_c}{h}\right) \right) + \sinh\left(\frac{n\pi R_c}{h}\right) \right) \right] \quad (\text{II.7})$$

Ensuite, il peut alors être calculé le rapport du débit de la canalisation principale et de la canalisation secondaire :

$$Q^*(R_c) = \frac{R_c}{2 \cdot w} \cdot \frac{1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{96 \cdot h}{(n \cdot \pi)^5 \cdot R_c} \cdot \left[\tanh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot w}{2 \cdot h}\right) \left(1 - \cosh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot R_c}{h}\right)\right) + \sinh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot R_c}{h}\right) \right]}{1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{192 \cdot h}{(n \cdot \pi)^5 \cdot w} \cdot \left[\tanh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot w}{2 \cdot h}\right) \right]} \quad (\text{II. 8})$$

Nous voyons que, pour une géométrie donnée, le rapport des débits Q^* est (1) défini par le rayon de coupure R_c est inversement et (2) est indépendant de la pression appliquée. Ce rapport des débits représente l'efficacité de filtration, pour un diamètre de filtration donné.

Ainsi, à partir du rayon de coupure R_c choisi, il est possible d'établir des jeux de paramètres tels que la largeur w , la hauteur h et la longueur L susceptibles de remplir les conditions de la séparation. Ceci revient, concrètement, à fixer les dimensions (w et h) des canalisations et à calculer les différentes longueurs des canalisations secondaires, adaptées à ce rayon de coupure R_c .

I.2. Calcul des dimensions des puces microfluidiques

Les dimensions des canalisations ont été calculées en appliquant une analogie avec un circuit électrique. Pour rappel, une des lois fondamentales de l'électricité est la loi d'Ohm : $U = R \cdot I$. Dans notre cas, nous pouvons considérer le débit proportionnel à la différence de pression Δp . En introduisant le terme de résistance hydrodynamique R_H , nous pouvons reformuler la loi d'Ohm (Figure II.2) comme suit :

$$\Delta p = R_H \cdot Q \quad (\text{II. 9})$$

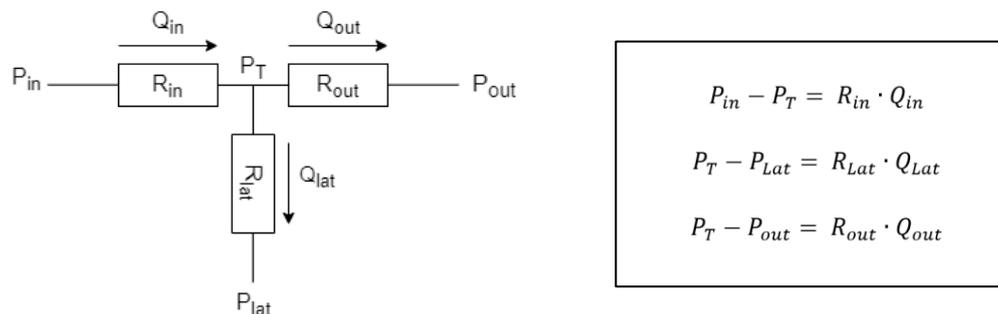


Figure II.2 - Analogie avec un circuit électrique, notion de résistance hydrodynamique.

A partir de cette reformulation de la loi d'Ohm (II-9), nous pouvons remonter à la valeur de la résistance de la canalisation :

$$R_H = \frac{12 \cdot \mu}{h^3 \cdot w} \cdot L_{in} \cdot \left[1 - \sum_{n=imp}^{\infty} \frac{192 \cdot h}{w \cdot (n \cdot \pi)^5} \cdot \tanh\left(\frac{n \cdot \pi \cdot w}{2 \cdot h}\right) \right]^{-1} \quad (II. 10)$$

Le dispositif microfluidique peut alors être représenté par la géométrie donnée Figure II.2 : un échantillon est injecté par l'entrée (notée in) et ressort par les sorties filtrées (notée Lat) et non filtrées (notée out). Il est alors possible de décrire la conservation des débits correspondant :

$$Q_{in} = Q_{Lat} + Q_{out} \quad (II. 12)$$

Le rapport des débits, dépendant des pressions appliquées et des résistances, peut alors être calculé :

$$Q^* = \frac{Q_{Lat}}{Q_{in}} \quad (II. 13)$$

En utilisant la loi d'Ohm et le théorème de Millman dans l'équation (II-12), il est possible d'exprimer le rapport des débits Q^* comme :

$$Q^* = \frac{R_{out} + R_{in} (1 - \Delta P^*)}{R_{out} + R_{Lat} \cdot \Delta P^*} \text{ avec } \Delta P^* = \frac{P_{in} - P_{out}}{P_{in} - P_{Lat}} \quad (II. 14)$$

Ce calcul peut aisément être étendu à N canalisation, Q^* étant constant à chaque intersection entre la canalisation principale et les canalisation secondaires.

$$Q^* = \frac{Q_{Lat 1}}{Q_{in1}} = \frac{Q_{Lat 2}}{Q_{in2}} = \dots = \frac{Q_{Lat n}}{Q_{in(n-1)}} \quad (II. 15)$$

$Q_{LAT,i}$ est le débit dans la canalisation secondaire i et $Q_{i,j}$ le débit de la canalisation principale entre les embranchements i et j. En écrivant la loi de conservation des débits, à chaque embranchement, il revient que :

$$Q_{out} = Q_{in}(1 - Q^*)^N \quad (II. 16)$$

En considérant que les embranchements sont équidistants :

$$P_{in} - P_{out} = R_{in} \cdot Q_{in} + R_m \cdot Q_{in} \cdot \sum_{i=1}^{N-1} (1 - Q^*)^i + R_{out} \cdot Q_{in}(1 - Q^*)^N \quad (II. 17)$$

Avec R_m la résistance de la canalisation principale entre deux embranchements.

Ces équations permettent de calculer les débits dans toutes les sections de la canalisation principale, ainsi que le débit dans chacune des canalisations secondaires. En considérant que la résistance hydrodynamique de l'intersection est négligeable, il est également possible de calculer la pression à chacune des intersections.

$$P_{in} - P_{out} = (P_{in} - P_1) + (P_1 - P_2) + \dots + (P_N - P_{out}) \quad (II.18)$$

Ainsi,

$$P_{in} - P_{out} = R_{in} \cdot Q_{in} + R_m \cdot Q_{1,2} + \dots + R_m \cdot Q_{N-1,N} + R_{out} \cdot Q_{out} \quad (II.19)$$

$$\frac{P_i - P_{out}}{Q_{lat(i)}} = R_{lat(i)} \quad (II.20)$$

Le rapport obtenu en (II.20) permet de déduire la résistance hydrodynamique de chacune des canalisations secondaires.

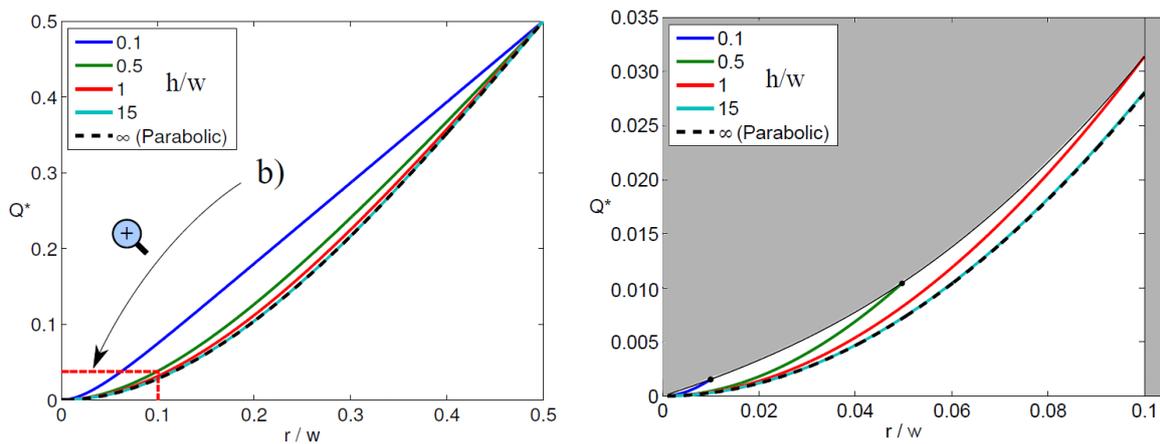


Figure II.3 - Tracé du modèle analytique. Tracé de Q^* en fonction du rapport r/w pour différents rapport h/w , vue plus zoomée [84].

Les rapports r/w étant de l'ordre de 0.003 et h/w de l'ordre de 1, nous avons considéré, en première approximation et d'après les travaux de Marc Fouet (Figure II.3), que le profil de vitesse était parabolique dans nos dispositifs :

$$v_{parabolique} = \frac{\Delta P}{3 \cdot \mu \cdot L} \cdot w^2 \cdot \left(1 - \left(\frac{2 \cdot y}{w}\right)^2\right) \quad (II.21)$$

Le rapport Q^* peut alors être ramené à :

$$Q_{parabolique}^* = \left(\frac{R_c}{w}\right)^2 \cdot \left(3 - \frac{2 \cdot R_c}{w}\right) \quad (II.22)$$

Par ailleurs, les valeurs des résistances hydrodynamiques sont données par :

$$R = \frac{12 \cdot \mu \cdot L}{w \cdot h^3 \cdot \left(1 - 0,63 \cdot \frac{h}{w}\right)} \quad (\text{II. 23})$$

Les paramètres L et w étant fixés, nous calculons les longueurs des canalisations secondaires de telle manière à ce que les valeurs des résistances hydrodynamiques respectent le rayon de coupure R_c . Ainsi les longueurs des canalisations peuvent être connues à partir des résistances approximées (II-16) :

$$L = \frac{w \cdot h^3 \left(1 - 0,63 \frac{h}{w}\right)}{12 \cdot \mu \cdot R} \quad (\text{II. 24})$$

Le but étant d'adapter ces modules pour le tri de vésicules plaquettaires ou d'exosomes, nous avons fixé le rayon de coupure R_c à 350 nm et à 100 nm. A partir de ces différents calculs, il est possible de dimensionner les dispositifs fluidiques et nous garderons inchangés paramètres suivants :

Viscosité dynamique μ	0.001 Pa.s
Pression en entrée principale P_{in}	1 bar
Pression en entrée principale P_{out}	0 bar

Tableau II.1 - Paramètres de viscosité et de pression fixes.

1.2.a. Dispositif 2D – Premier dispositif à 1 canalisation secondaire

Dans le but de valider le principe de filtration hydrodynamique, nous avons réalisé une puce microfluidique très simple. Pour cela, nous avons imaginé la structure la plus élémentaire : une canalisation principale à laquelle sera connectée une seule canalisation secondaire.

Pour déterminer la longueur de la canalisation secondaire, nous avons fixé les paramètres suivants : la canalisation principale aura une section de $300 \times 100 \mu\text{m}^2$. La hauteur de $100 \mu\text{m}$ est fixée par des contraintes technologiques que nous expliquerons plus tard, tandis que la largeur de la canalisation, a été fixée à $300 \mu\text{m}$, pour des raisons de fabrication et de structure. En effet, en choisissant des canalisations plus larges, des risques d'effondrement et de fluage des parois supérieures des canalisations sont importants. Aussi, nous choisissons une canalisation secondaire de section $10 \times 100 \mu\text{m}^2$. En effet, dans cette condition, nous sommes dans le cas où les dimensions de la canalisation secondaire sont largement supérieures aux dimensions des particules à filtrer. De plus, ces dimensions sont bien

supérieures aux limites de résolution des technologies de structuration des résines photosensibles. Aussi, les dimensions h et w de la canalisation secondaire sont choisies de manière à avoir un débit important et donc à maximiser le débit de filtration.

Paramètres dispositif 1 canalisation secondaire	RAYON DE COUPURE	350 nm
	NOMBRE DE CANALISATION SECONDAIRE	1
	LARGEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	300 µm
	HAUTEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	100 µm
	LONGUEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	3113 µm

Tableau II.2 – Présentation des paramètres imposés pour la réalisation du dispositif de tri à une canalisation secondaire.

Dans ce cas, la valeur de Q^* est de $4.08 \cdot 10^{-6}$. Comme attendu, la valeur de Q est très faible. Afin de travailler dans des conditions exploitables, il est donc nécessaire de multiplier le nombre de canalisations et d'optimiser les caractéristiques de la puce.

Paramètres dispositif 1 canalisation secondaire	SECTION CANALISATION SECONDAIRE	10 x 100 µm
	Canalisation (L_1)	4.72 cm
	DEBIT THEORIQUE DE LA CANALISATION SECONDAIRE (Pour $\Delta P = 1$ Bar)	0.00256 µL/s

Tableau II.3 – Dimension de la canalisation secondaire et valeur du débit théorique.

1.2.b. Dispositif 2D – Dispositif à 10 canalisations secondaires

Un second dispositif a été mis en place, en parallèle du dispositif à 1 canalisation secondaire, toujours avec un rayon de coupure $R_c = 350$ nm. Nous avons choisi de passer à un dispositif comportant 10 canalisations secondaires afin d'augmenter le débit de filtration du système, comme suggérer précédemment.

Une des conséquences de la multiplication du nombre de canalisations secondaires est l'allongement de la canalisation principale. La perte de charge qui en découle réduit le débit entrant et donc le débit de filtration. Pour limiter ce problème, nous avons réduit les longueurs d'entrée et de sortie de la canalisation principale. Ce nouveau dispositif, ayant la même dimension (1.5×2 cm) que la puce présentée ci-dessus est représenté en Figure II.4. Ses caractéristiques sont données dans le tableau suivant.

Paramètres dispositif 10 canalisations secondaires	RAYON DE COUPURE	350 nm
	NOMBRE DE CANALISATION SECONDAIRE	10
	LARGEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	300 μm
	HAUTEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	100 μm
	LONGUEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	
	Longueur de l'entrée	413 μm
	Longueur de la sortie principale	600 μm
	SECTION CANALISATION SECONDAIRE	10 x 100 μm
Canalisation la plus longue (L_1)	30.2 cm	
Canalisation la plus courte (L_{10})	4.72 cm	
DEBIT THEORIQUE DE LA CANALISATION SECONDAIRE (Pour $\Delta P = 1$ Bar)	0.0223 $\mu\text{L/s}$	

Tableau II.4 - Présentation des paramètres imposés, dimensions des canalisations secondaires et valeur du débit théorique, pour la réalisation du dispositif de tri à dix canalisations secondaires.

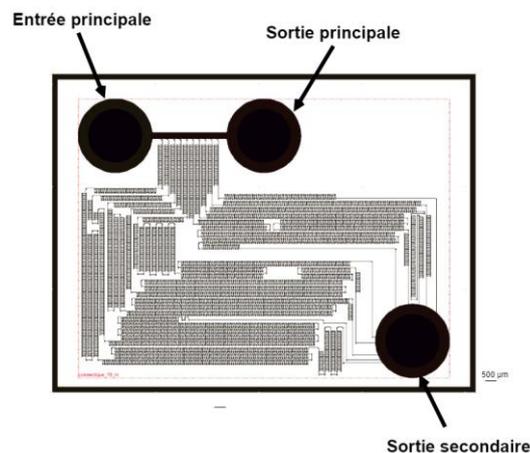


Figure II.4 - Design du dispositif à 10 canalisations secondaires.

I.2.c. Dispositif 3D – Dispositif à 100 canalisations secondaires

Compte tenu de ce qui précède, nous avons imaginé des dispositifs permettant une récupération d'échantillon filtré plus rapide et un pourcentage de volume filtré plus conséquent.

Dans un premier temps, nous avons imaginé travailler à partir des conditions présentées précédemment.

Paramètres dispositif 100 canalisations secondaires	RAYON DE COUPURE	350 nm
	NOMBRE DE CANALISATION SECONDAIRE	100
	LARGEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	100 μm
	HAUTEUR DE CANALISATION PRINCIPALE	300 μm
	LONGUEUR DE CANALISATION PRINCIPALE Longueur de l'entrée Longueur de la sortie principale	413 μm 600 μm

Tableau II.5 - Présentation des paramètres imposés pour la réalisation du dispositif de tri à cent canalisations secondaires.

Cependant nous nous sommes rapidement rendu compte que les longueurs des canalisations secondaires ne seraient pas réalisables dans nos dispositifs comme en atteste le tableau suivant.

Paramètres dispositif 100 canalisations secondaires	SECTION CANALISATION SECONDAIRE	10 x 100 μm
	Canalisation la plus longue (L_1)	2.9 m
	Canalisation la plus courte (L_{100})	3.5 cm
	DEBIT THEORIQUE DE LA CANALISATION SECONDAIRE (Pour $\Delta P = 1$ Bar)	0.026 $\mu\text{L/s}$

Tableau II.6 - Dimensions des canalisations secondaires et valeur du débit théorique.

Pour pallier ce problème, nous avons réfléchi à une nouvelle structure des dispositifs et, nous avons imaginé une structure en 3D c'est-à-dire composée de deux niveaux de canalisations. Le premier niveau de canalisation comprendra la canalisation principale de 100 μm de profondeur ainsi que le départ des canalisations secondaires qui posséderont également cette même profondeur (100 μm). Pour la suite de ce manuscrit, nous appellerons ces départs de canalisations secondaires, canalisations intermédiaires (Figure II.5). Puis, dans un second niveau, nous réaliserons les canalisations secondaires. Le fait d'avoir les canalisations sur deux niveaux de structures indépendantes nous permet de choisir une profondeur de canalisation secondaire différente de la canalisation principale. Aussi, afin d'augmenter la résistance, ce qui revient à diminuer les longueurs des canalisations secondaires, nous avons choisi de réaliser des canalisations secondaires de section $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Ce choix est guidé par des considérations technologiques et nous permet la réalisation des dispositifs plus aisée.

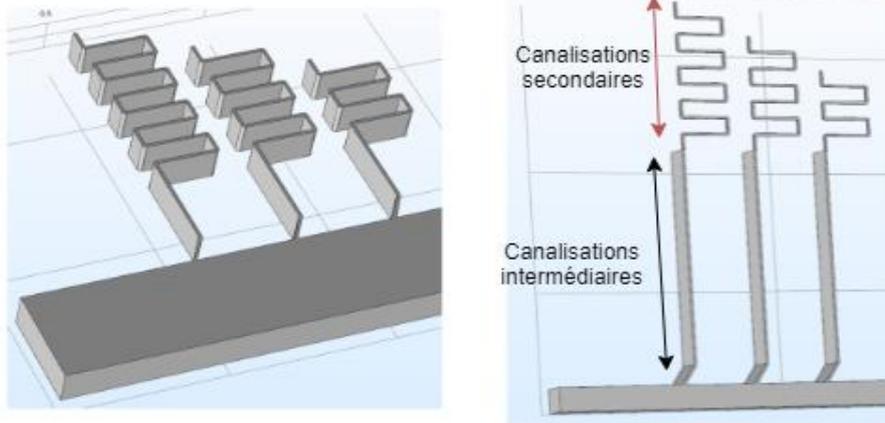


Figure II.5 - Explication des canalisations intermédiaires. A gauche schéma d'un dispositif en 2D. A droite, présentation 3D de la canalisation principale et de canalisations intermédiaires dans le même niveau et de canalisations secondaires dans un second niveau.

Paramètres dispositif 100 canalisations secondaires « 3D »	RAYON DE COUPURE	350 nm
	NOMBRE DE CANALISATIONS SECONDAIRES	100
	PARAMETRES DE LA CANALISATION PRINCIPALE	
	Largeur	100 μm
	Hauteur	110 μm
	Longueur de l'entrée	1250 μm
	PARAMETRES DES CANALISATIONS « INTERMEDIAIRES »	
	Largeur	10 μm
	Hauteur	110 μm
	Longueur	1000 μm
SECTION CANALISATION SECONDAIRE		10 x 10 μm
Canalisation la plus longue (L_1)		7.59 cm
Canalisation la plus courte (L_{100})		0.12 cm
DEBIT THEORIQUE DE LA CANALISATION SECONDAIRE (Pour $\Delta P = 1 \text{ Bar}$)		0.037 $\mu\text{L/s}$

Tableau II.7 - Présentation des paramètres imposés, dimensions des canalisations secondaires et valeur du débit théorique, pour la réalisation du dispositif de tri à cent canalisations secondaires, en « 3D ».

Toutefois, le rajout d'un niveau supplémentaire change peu les calculs expliqués précédemment. En effet, il suffit de prendre en compte la résistance supplémentaire (correspondant à la résistance des canalisations intermédiaires). Celle-ci est négligeable devant la résistance des canalisations secondaires. L'ajout de ce niveau permet néanmoins

de diminuer considérablement les longueurs des canalisations secondaires et d'obtenir les résultats présentés dans le tableau donné en suivant.

Le design de la nouvelle configuration du dispositif à 100 canalisations secondaires se compose donc de deux niveaux : (1) le premier, comporte donc la canalisation principale ainsi que les 100 canalisations intermédiaires (Figure II.6A) et (2) le second niveau dans lequel les 100 canalisations secondaires sont imaginées (Figure II.6B). Nous avons également rajouté une entrée à notre dispositif afin d'acheminer un tampon. Cette entrée supplémentaire (dite entrée buffer) permettra de venir plaquer l'écoulement de l'échantillon contre la paroi et ainsi, augmenter le rendement de filtration lors des manipulations.

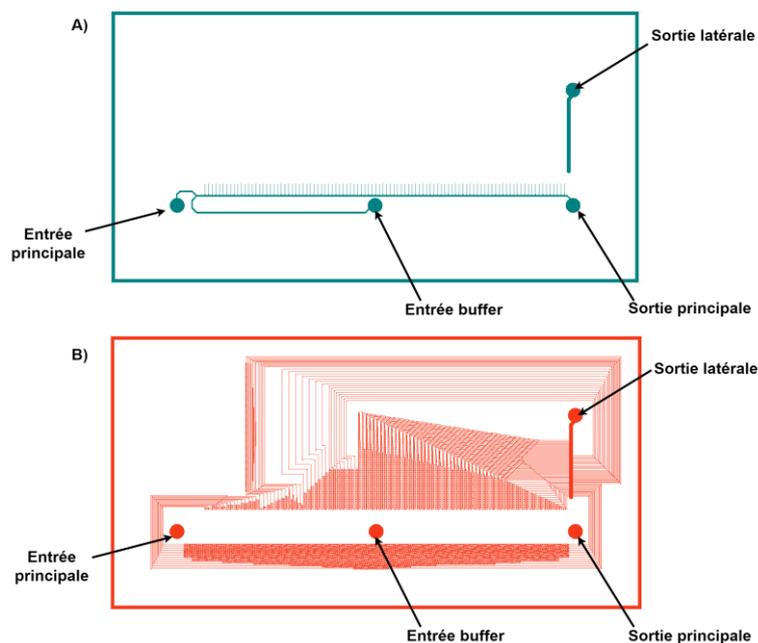


Figure II.6 - Design du dispositif à 100 canalisations secondaires. A) Niveau 1 : représentation de la canalisation principale et des canalisations intermédiaires. B) Niveau 2 : représentation des 100 canalisations secondaires.

Le dispositif final, composé de 100 canalisations secondaires à un rayon de coupure R_c de 350 nm, est représenté en Figure II.7.

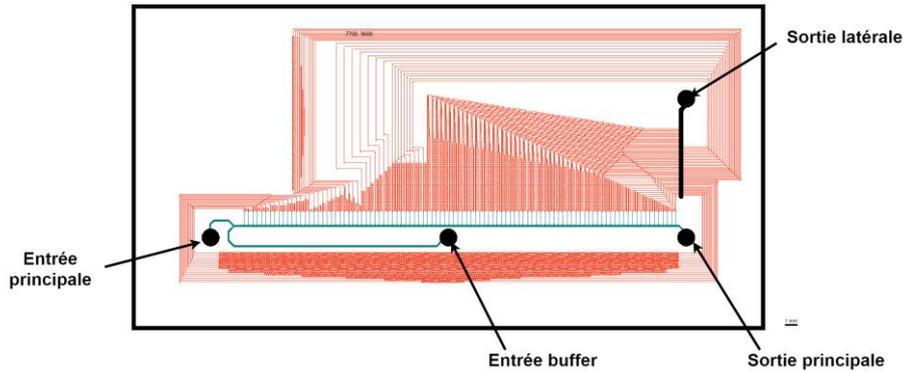


Figure II.7 - Design assemblé du dispositif de tri à 100 canalisations secondaires.

I.2.d. Dispositif 3D – Dispositif adapté au tri des exosomes

En plus de l'ensemble des dispositifs présentés dans les paragraphes précédents, nous avons également conçu un dispositif de tri adapté à la séparation des exosomes. Pour cela, nous avons choisi de diminuer le rayon de coupure R_c à 100 nm. Nous avons appliqué les mêmes conditions de conception, c'est-à-dire en 3 dimensions, en créant, sur un niveau la canalisation principale et des canalisations intermédiaires puis sur un second niveau et les 100 canalisations secondaires.

Paramètres dispositif 100 canalisations secondaires $R_c = 100 \text{ nm}$	RAYON DE COUPURE	100 nm
	NOMBRE DE CANALISATION SECONDAIRE	100
	PARAMETRES DE LA CANALISATION PRINCIPALE	
	Largeur	100 μm
	Hauteur	110 μm
	Longueur	1250 μm
	PARAMETRES DES CANALISATIONS « INTERMEDIAIRES »	
	Largeur	10 μm
	Hauteur	110 μm
Longueur	1000 μm	
SECTION CANALISATION SECONDAIRE	5 x 5 μm	
Canalisation la plus longue (L_1)	6.83 cm	
Canalisation la plus courte (L_{100})	0.13 cm	
DEBIT THEORIQUE DE LA CANALISATION SECONDAIRE (Pour $\Delta P = 1 \text{ Bar}$)	0.00295 $\mu\text{L/s}$	

Tableau II.8 - Présentation des paramètres imposés, dimensions des canalisations secondaires et valeur du débit théorique, pour la réalisation du dispositif de tri à cent canalisations secondaires, $R_c = 100 \text{ nm}$.

I.3. Récapitulatif des différents dispositifs microfluidiques réalisés

	$R_c = 350 \text{ nm}$			$R_c = 100 \text{ nm}$
	1 CANALISATION SECONDAIRE	10 CANALISATIONS SECONDAIRES	100 CANALISATIONS SECONDAIRES	100 CANALISATIONS SECONDAIRES
CANALISATION PRINCIPALE	100 x 300 μm	100 x 300 μm	100 x 110 μm	100 x 110 μm
CANALISATION INTERMEDIAIRE	-		10 x 110 μm	10 x 110 μm
CANALISATION(S) SECONDAIRE(S)	Section : 10 x 100 μm	Section : 10 x 100 μm	Section : 10 x 10 μm	Section : 5 x 5 μm
	$L_1 = 4.72 \text{ cm}$	$L_1 = 30.20 \text{ cm}$ $L_{10} = 4.72 \text{ cm}$	$L_1 = 7.59 \text{ cm}$ $L_{100} = 0.12 \text{ cm}$	$L_1 = 6.83 \text{ cm}$ $L_{100} = 0.13 \text{ cm}$
DEBIT THEORIQUE ($\Delta P = 1 \text{ BAR}$)	0.00256 $\mu\text{L/s}$	0.0223 $\mu\text{L/s}$	0.037 $\mu\text{L/s}$	0.00295 $\mu\text{L/s}$
TEMPS POUR RECUPERER 35 μL	Environ 3h40	Environ 20 minutes	Environ 15 minutes	Environ 3h15

Tableau II.9 – Tableau synthèse des dimensions des canalisations principales et secondaires, des débits théoriques et du temps nécessaire pour récolter 35 μL de solution filtrée, pour les dispositifs à 1, 10 et 100 canalisations secondaires pour $R_c = 350 \text{ nm}$ et $R_c = 100 \text{ nm}$.

II. Technologie de fabrication des puces microfluidiques

Dans cette partie, nous allons détailler l'ensemble des techniques développées pour la fabrication des différents dispositifs microfluidiques. Pour cela, nous avons envisagé deux technologies de fabrication (1) une technologie PDMS classique mais aussi (2) une technologie utilisant des films secs photosensibles. En effet, cette dernière présente de nombreux avantages. Elle permet la réalisation de structures complexes, notamment par superposition de niveaux de canalisation. Elle est également compatible avec le dépôt de couches métalliques, qui pourrait être nécessaire lors du couplage avec le module de piégeage immunologique. Enfin, il s'agit d'une technique industriellement manufacturable.

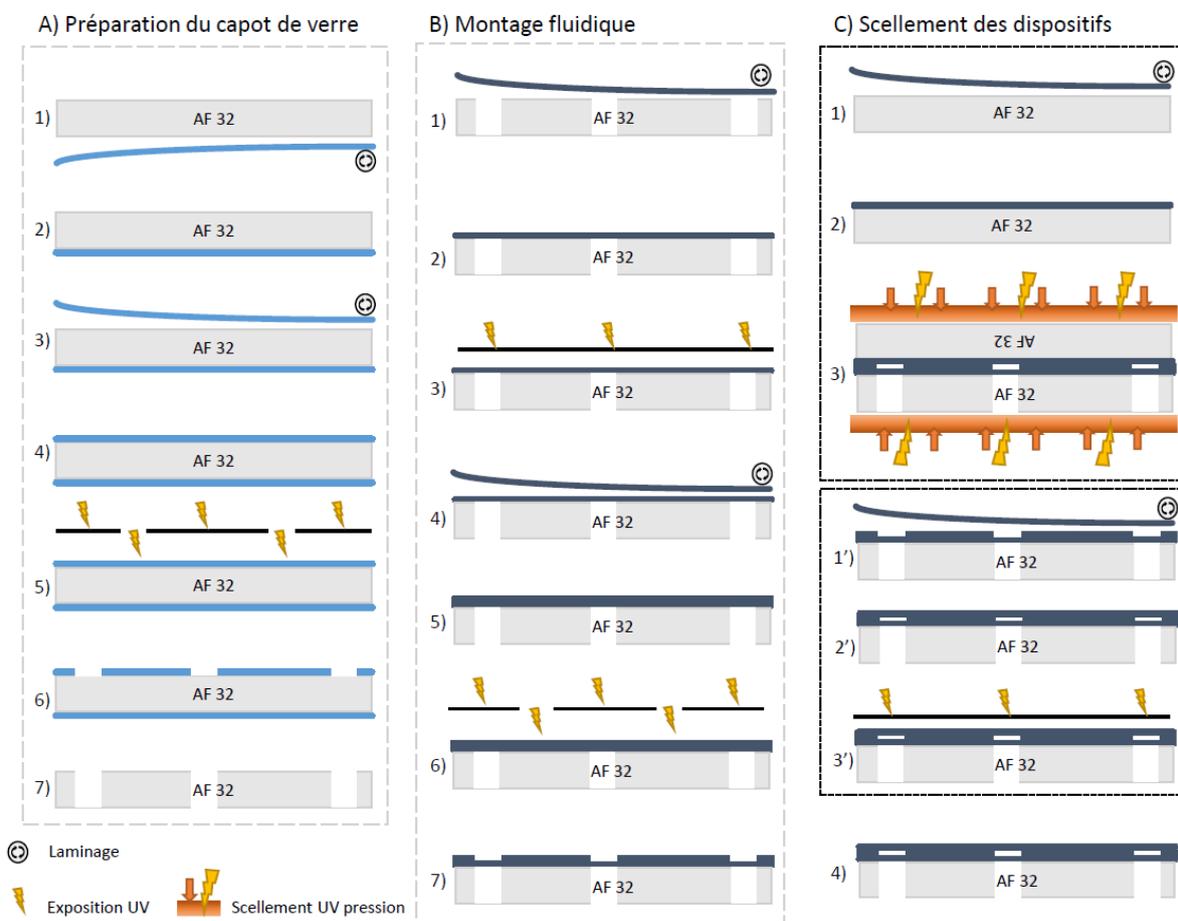


Figure II.8 - Schéma du procédé de fabrication des dispositifs de tri à 1 et 10 canalisations secondaires. A) Fabrication du capot de verre sur un substrat de verre et perçage du verre à la sableuse. B) Différentes étapes du montage fluide sur le substrat de verre préalablement percé. C) Explication des deux types de scellement (capot DF ou capot verre) par pression et insolation.

II.1. Présentation de la technologie « films secs »

Le procédé de fabrication par laminage de films secs photosensibles se décompose en trois principales étapes schématisées sur la Figure II.8. La première étape consiste à préparer un substrat de verre sur lequel sera laminé le réseau de canalisations. La deuxième repose sur la structuration des canalisations à proprement parler et enfin, la dernière, permet le scellement du dispositif afin de rendre celui-ci étanche.

II.1.a. Préparation du substrat et des ouvertures fluidiques

Nous avons choisi de travailler sur un substrat de verre AF-32 de 4" et de 500 μm d'épaisseur, commercialisé par la société Schott. Nous avons choisi d'utiliser ce type de wafer, transparent, car nous travaillerons par la suite en microscopie optique. La première étape consiste à percer les wafers afin de réaliser les orifices d'entrées et de sortie des fluides. Une première solution utilisée a été le perçage du verre à l'aide d'une sableuse. Cette étape peut se réaliser directement au laboratoire. Le wafer de verre doit toutefois être préalablement protégé par un film (utilisation de la résine photosensible PH-2040, Photec PH-2000 Series). En effet, les projections des grains de sable, provoquées par la sableuse lors de l'utilisation de celle-ci, peuvent détériorer la surface du verre. Ainsi, ce film photosensible, est laminé sur les deux faces du substrat, puis seulement l'une des deux faces est insolée à l'aide d'un masque de photolithographie dans le but de reproduire les motifs des ouvertures fluidiques. Une fois les ouvertures imprimées sur la résine, le substrat de verre peut alors être percé aux endroits voulus. Enfin, pour être utilisé, le wafer de verre doit être nettoyé à l'aide de différents bains : (1) un premier d'acétone permettant d'enlever le film photosensible du substrat, puis (2) dans un bain de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ afin d'éliminer toutes les impuretés encore présentes en surface. Le perçage des ouvertures microfluidiques à l'aide de la sableuse (Figure II.9A) présente un aspect comportant peu d'éclat et dans les dimensions attendus (diamètre entre 1000 et 1200 μm , selon la buse utilisée). Cependant, cette technique de perçage présente un défaut majeur : un manque de précision de la position des perçages. En effet, cette imprécision peut rendre les dispositifs microfluidiques inutilisables (Figure II.9C).

L'ensemble des étapes de fabrication des capots de verre percés à la sableuse sont résumées dans le tableau Annexe II.1.

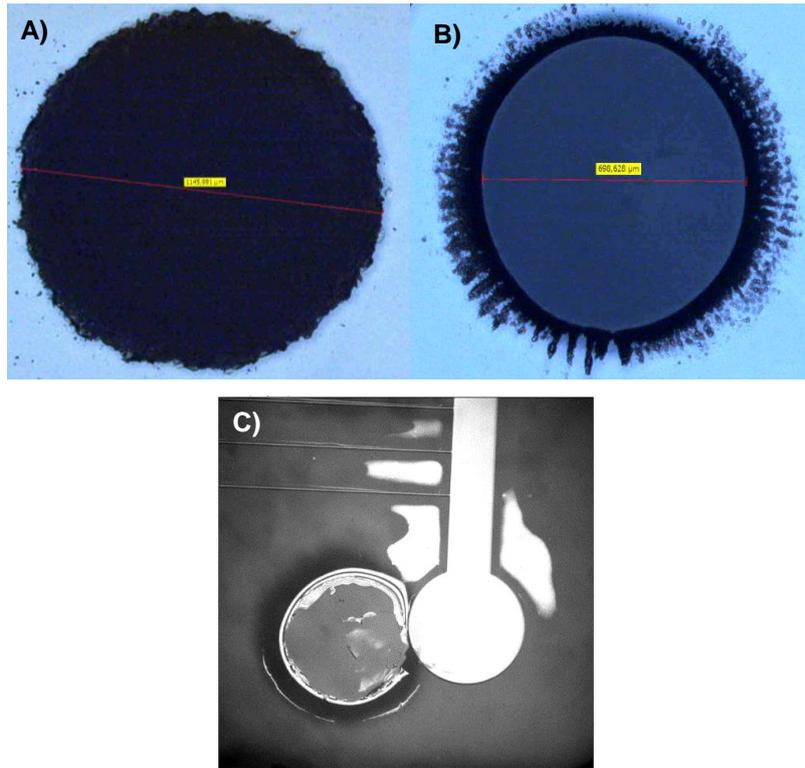


Figure II.9 - Observations au microscope électronique des différents perçages. A) Perçage réalisé à l'aide de la sableuse (réalisé au LAAS-CNRS), ouverture sans éclat de verre, à la taille attendue. B) Perçage réalisé à l'aide d'un laser UV (réalisé par l'IEMN), éclat de verre observé. C) Décalage entre l'ouverture fluïdique du motif et l'ouverture percée, la puce fluïdique est inutilisable.

Ainsi, pour pallier le problème de positionnement des ouvertures fluïdiques, nous avons sollicité l'IEMN (Institut d'Electronique et de Microélectronique Nanotechnologie) de Lille qui dispose d'une technique de perçage par laser UV. Ainsi, en leur fournissant le masque de photolithographie des ouvertures, le perçage se fait de façon automatique et sans aucun décalage lié à la manipulation. Cependant, comme le montre la Figure II.9B, le contour des ouvertures réalisé au laser comporte de nombreuses imperfections notamment dues aux éclats du verre lors du passage du laser. Ces défauts pourront poser problème lors du montage fluïdique final. Une fois le substrat percé dans ces nouvelles conditions, il est nettoyé dans un bain de H_2O_2/H_2SO_4 avant d'être utilisé.

II.1.b. Réalisation du réseau de canalisation

Une fois les capots prêts à être utilisés, il est possible de monter, sur ce substrat de verre, la partie fluïdique. Pour cela, nous avons repris et adapté un procédé de fabrication innovant, développé au LAAS-CNRS, utilisant le laminage successif de films secs [85].

Ce type de fabrication possède plusieurs avantages. Il permet un gain de temps de fabrication : environ 1h30 pour la structuration de résine SU-8 50 μm et 30 minutes pour du film sec et est plus économique (16 € pour la SU-8 contre 1,6 € pour le film sec) [86]. Les films DF (commercialisés par la société Engineered Materials Systems), sont disponibles au laboratoire, aux épaisseurs suivantes : 5 μm (DF-1005), 20 μm (DF-1020), 25 μm (DF-1025), 50 μm (DF-1050) et 100 μm (DF-10100). Ils sont basés sur une résine négative de type époxy similaire à la résine SU-8. Ainsi, lors des étapes de photolithographie, les zones qui auront été insolées réticuleront et ne seront pas dissoutes lors du développement.

Pour la réalisation des deux dispositifs de tri à 1 et 10 canalisations secondaires, les films photosensibles DF-1005 et DF-10100 ont été utilisés. Sur un substrat de verre, préalablement nettoyé et activé par plasma O_2 , est laminée (utilisation de la plastifieuse Shipley 3024) une première couche de DF-1005. Ce niveau de résine est réalisé dans le but d'avoir le même matériau sur les différentes parois des canalisations. Une fois laminée, la résine est insolée (à l'aide de l'aligneur SUSS MicroTec MA6 Gen4) et recuite afin d'être réticulée. Ensuite, une étape de plasma O_2 est de nouveau réalisée pour permettre l'adhérence d'une nouvelle couche de résine. Une seconde étape de laminage est réalisée afin de créer les motifs fluidiques. Pour cela, une couche de DF-10100 μm est laminée. Lors de l'insolation de cette couche, une étape d'alignement est nécessaire afin de positionner correctement les ouvertures présentes sur le masque de photolithographie et les ouvertures percées dans le substrat de verre puis un recuit est nécessaire pour terminer la structuration des canalisations. La dernière étape, schématisée Figure II.8C, consiste à fermer la structure des canalisations fluidiques. Le protocole de fabrication du réseau de canalisations des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires est expliqué dans le tableau Annexe II.2 et illustré en Figure II.8C.

II.1.c. Scellement des dispositifs

Afin de fermer les canalisations fluidiques, une étape de scellement est nécessaire. Pour cela, nous avons réalisé deux types de capotage (Figure II.8C) : (1) un premier capot utilisant la résine DF et (2) un second capotage réalisé à l'aide d'un substrat de verre. Pour réaliser le premier capot, une nouvelle couche de DF est laminée sur le montage fluidique préalablement préparé. Cette couche est ensuite soumise à une exposition UV plus longue et à un recuit sur plaque chauffante avec une rampe de température afin de bien réticuler la résine. Nous avons testé différentes épaisseurs de DF (DF-1005, DF-1025 et DF-10100) afin de jouer sur la rigidité et l'étanchéité de cette couche. Toutefois, pour contourner le problème de décollement des couches de films secs observés au moment de la découpe des différentes puces, nous avons mis au point un second type de capotage des canalisations fluidiques. Pour cela, un second substrat de verre est utilisé pour venir sceller les structures. Sur celui-ci, une couche

de DF-1005 a été préalablement laminée sans toutefois être insolée. Ensuite, les deux substrats, sont mis en contact, puis mis sous pression à l'aide d'un équipement de nanoimpression (Nanonex) permettant une insolation UV simultanément. Les différentes étapes des techniques de scellement des dispositifs sont détaillées dans le tableau en Annexe II.3.

Les dispositifs à 1 et 10 canalisations ainsi réalisés et présentés en Figure II.10.

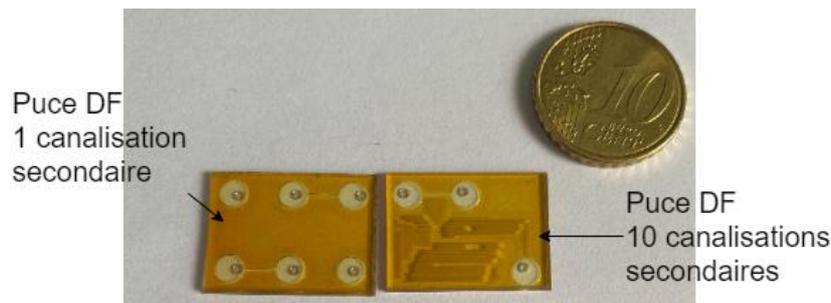


Figure II.10 - Dispositifs 1 et 10 canalisations secondaires après capotage et scellement à l'aide d'un substrat de verre.

II.1.d. Techniques de fabrication 3D des puces microfluidiques

Nous allons maintenant discuter des différents protocoles mis en place afin de réaliser les dispositifs composés de 100 canalisations secondaires. Cette réalisation comportera un niveau microfluidique supplémentaire ce qui complexifie la technologie de fabrication. La technique utilisée pour fabriquer ces dispositifs à 100 canalisations est semblable à celle présentée précédemment.

Dans un premier temps, sur un substrat de verre préalablement percé et nettoyé par plasma, une fine couche de DF-1005 est laminée, isolée et recuite. Puis, deux couches de DF-1050 sont laminées. Ce niveau de 100 μm sera insolé à l'aide d'un masque de photolithographie afin de structurer la canalisation principale ainsi que les canalisations intermédiaires. Une étape de recuit et de développement est nécessaire afin de faire apparaître les motifs des canalisations. Une nouvelle étape de traitement plasma est réalisée avant de monter deux nouvelles couches de DF-1005, qui permettront la réalisation du réseau des canalisations secondaires. La résine est réticulée par PEB et les structures des canalisations secondaires sont dévoilées après développement. Une nouvelle couche de DF-1025 est laminée dans le but de faire un pré-capotage du système. Pour éviter les risques d'effondrement de cette nouvelle couche, la température de laminage est diminuée tandis que le temps de réticulation est augmenté et le PEB rallongé en appliquant une rampe de température. Enfin, nous avons eu, comme lors de la réalisation des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires, deux

possibilités de capotage : un capotage DF et un capotage à l'aide d'un autre substrat de verre. Toutes les étapes de fabrication de ces puces sont schématisées Figure II.11 et détaillées Annexe II.4.

Lors de la mise en œuvre de cette technologie en « 3D », deux difficultés majeures ont été rencontrées : (1) lors de l'alignement des deux niveaux de canalisation et (2) lors du capotage final des dispositifs. Le premier problème a pu être résolu de façon rapide. En effet, en laissant un temps de relaxation suffisant (minimum 4 heures de repos), la contrainte du film sec, générée lors de l'étape de laminage, diminue et facilite l'étape d'alignement des deux niveaux. En plus de ce temps de pause, le design a été modifié dans le but de d'améliorer l'alignement. En effet, des ouvertures en forme de poire ont été ajoutés aux extrémités des canalisations intermédiaires et permettent, ainsi, une marge d'erreur plus importante lors de l'alignement semi-automatique. Nous avons vérifié l'effet de cet ajout de réservoir entre la canalisation principale et les canalisations secondaires, par simulation de l'écoulement à l'aide du logiciel COMSOL. Nous en avons conclu qu'il n'y avait pas, à priori, de perturbation significative liée à la présence de celui-ci. Cependant, un réservoir en forme de poire et présents aux extrémités des canalisations secondaires semble, toutefois, préférable (Figure II.12). Concernant les difficultés rencontrées durant l'étape de scellement des dispositifs, plusieurs tests de collage utilisant une association d'exposition UV et de pression ont été réalisés. En utilisant une couche de DF-1005 sur un substrat de verre non percé, celle-ci a flué (Figure II.13A) dans les canalisations secondaires bouchant partiellement ou complètement les canalisations secondaires. Ainsi, il a été choisi de pré-capoter le dispositif à l'aide d'une fine couche de film sec (DF-1025). Or, malgré cette étape, la présence de nombreuses bulles d'air a été observée après insolation UV et application de pression (Figure II.13B). De plus, une dose d'insolation UV, trop importante, a provoqué le fluage du film sec, rendant les dispositifs totalement inutilisables (Figure II.13C). Aussi, afin de contourner le problème de scellement avec un capot de verre, nous avons également réalisé un capot à l'aide de films secs de différentes épaisseurs. Toutefois, ce type de scellement, trop fragile, se décolle lors de la découpe des dispositifs à l'aide d'une scie diamantée, ou fendille lors de l'injection de flux.

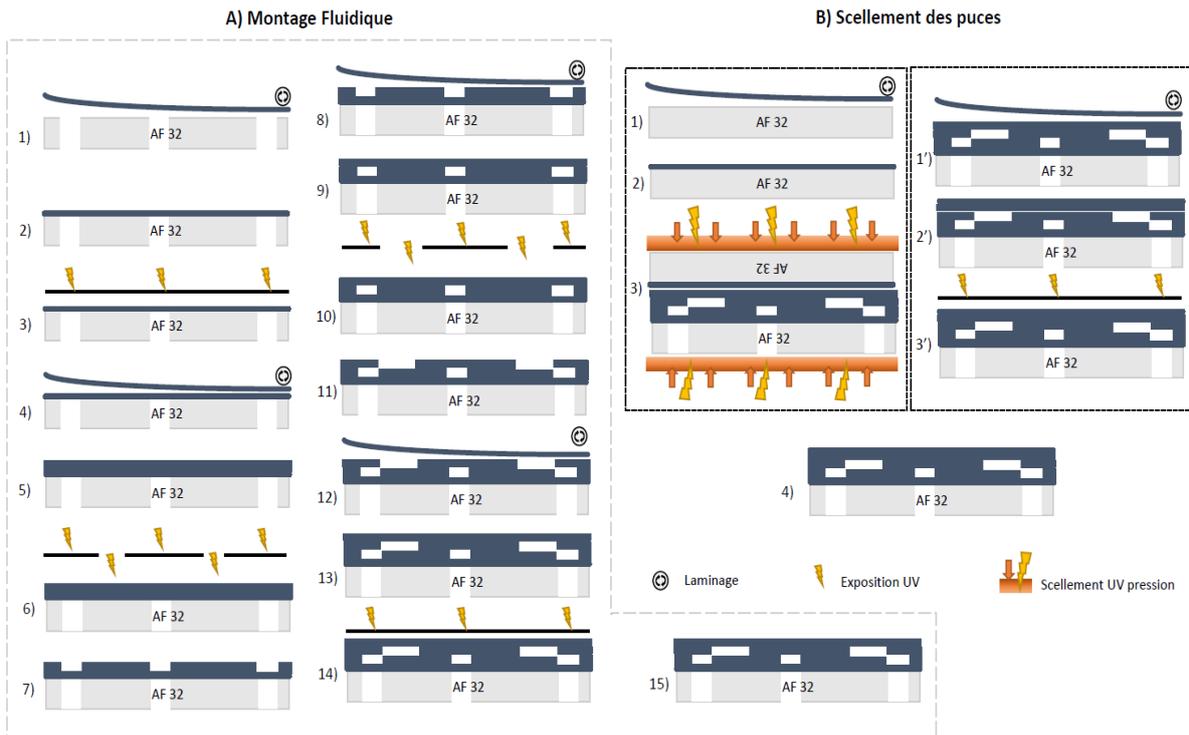


Figure II.11 - Schéma détaillant les différentes étapes de fabrication des dispositifs de tri à 100 canalisations secondaires. A) Différentes étapes de fabrication des couches DF sur lesquelles sont reportées les canalisations fluidiques. B) Explications des deux techniques de capotages : à l'aide d'une couche de film photosensible ou à l'aide d'un substrat de verre.

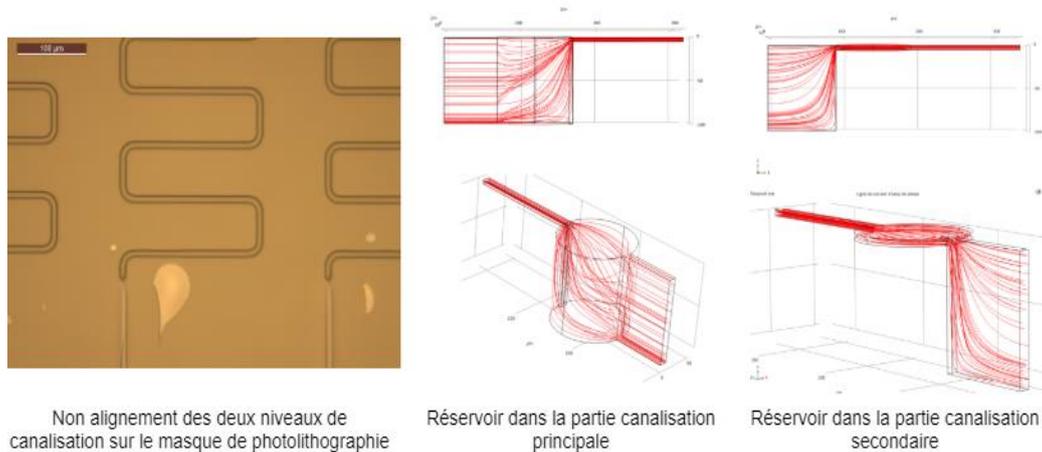


Figure II.12 - Problème lié à l'alignement des deux niveaux de canalisations, observation au microscope. Étude de l'effet d'un réservoir entre les canalisations principales et secondaires sur l'écoulement.

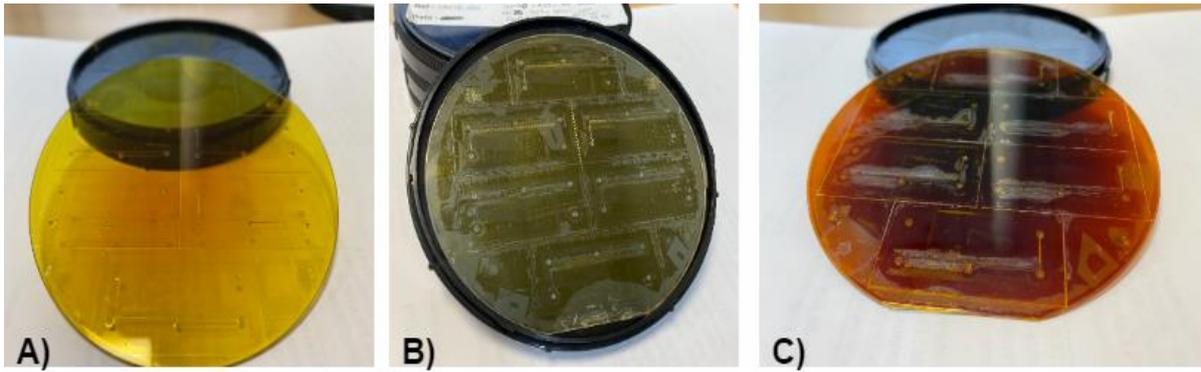


Figure II.13 – Présentation de différents dispositifs capotés, réalisés par UV et pression. A) Canalisations secondaires bouchées par le DF. B) DF brûlé après le scellement. C) Bulles d'air emprisonnées entre les deux couches de DF.

Toutes ces difficultés rencontrées sont liées principalement à empilement des couches. Comme illustrés sur la Figure II.14, des bourrelets se forment de part et d'autre des canalisations créent une topographie de surface qu'il est difficile d'éliminer par la suite.

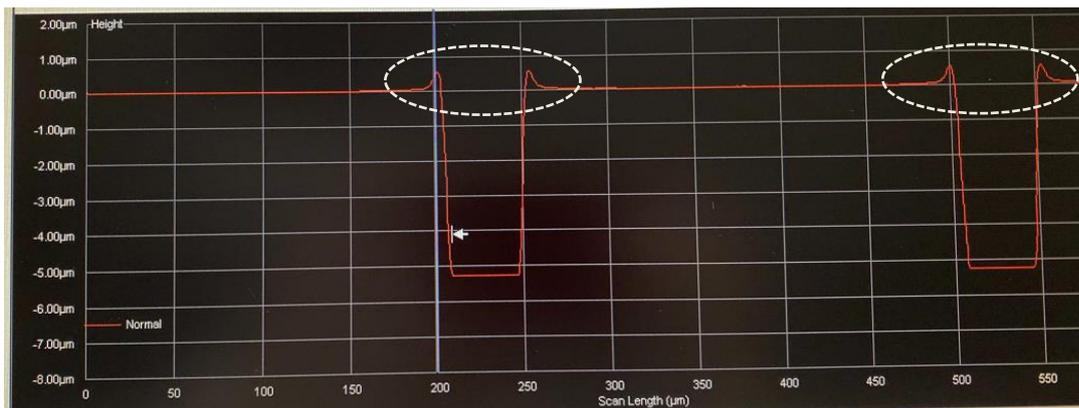


Figure II.14 - Observation au profilomètre optique, des bourrelets aux niveaux de canalisations de 5 μm .

II.2. Technologie PDMS

Le PDMS ou PolyDiMéthylSiloxane [87] reste de loin le matériau le plus utilisé en microfluidique. Ce polymère possède plusieurs avantages. D'un point de vue technique, sa mise en œuvre est simple, rapide et ne demande pas de conditions (température et pression) particulières. De plus, le PDMS reste assez bon marché comparé aux autres techniques (moins de 200 euros pour 1kg de préparation). Aussi, de par sa souplesse, le PDMS s'adapte mieux au support et permet une forte adhésion sur des substrats de verre par exemple. Enfin, le PDMS est biocompatible et transparent ce qui correspond à nos attentes expérimentales.

La fabrication des puces microfluidiques se déroule en deux étapes : (1) la réalisation du moule en silicium et résine photosensible puis (2) le coulage du PDMS. La première étape, réalisée en salle blanche possède des similitudes avec la fabrication expliquée précédemment. Cependant, une différence est à noter : l'utilisation d'un substrat de silicium à la place du substrat de verre. Dans un premier temps, le substrat est nettoyé par plasma O_2 , puis un promoteur d'adhérence est déposé à l'aide d'une tournette afin d'améliorer l'adhérence des deux laminages successifs de films DF-1005. Cette couche de résine est insolée à l'aide d'un masque de photolithographie sur laquelle est reportée l'ensemble des canalisations secondaires. Un court PEB est réalisé afin de polymériser la résine, mais l'étape de développement n'est pas réalisée. Le laminage des deux films induisant une contrainte sur le substrat, un temps de pause (2 heures minimum) est laissé avant de passer au second niveau de canalisations. Après ce temps de relaxation, deux nouvelles couches de DF-1050 sont laminées. Une étape d'alignement est appliquée afin de permettre la connexion entre les deux niveaux des canalisations. Lors de cet alignement, le niveau de $100\ \mu\text{m}$ est insolé, recuit et enfin l'ensemble des résines est développé dans plusieurs bains de cyclohexanone. Lors de cette étape, la vitesse de rotation des bains doit être faible afin de ne pas provoquer de déformation des canalisations. Une fois la résine développée et rincée à l'isopropanol, un greffage de FDTS (Perfluorodecyltrichlorosilane) hydrophobe et anti adhésif de FDTS et un dépôt d'oxyde de silicium (SiO_2) sont appliqués, lors d'une même étape de traitement de surface. L'ensemble des étapes est décrit dans le tableau Annexe II.5 et schématisé dans la Figure II.15A.

Une fois le moule Si-DF réalisé, un mélange de polymère et réticulant est préparé puis placé sous cloche à vide jusqu'à disparition totale des bulles d'air. Ce mélange peut ensuite être versé délicatement sur le moule Si-DF (Figure II.15B, Annexe II.6) puis de nouveau mis sous vide. Une fois le PDMS entièrement dégazé, le moule est placé dans une étuve afin que le polymère réticule. Une fois celui-ci réticulé, le polymère devenu solide peut alors être démoulé (Figure II.15C). Les puces sont découpées individuellement en suivant les lignes de découpe définies sur les masques de photolithographie des dispositifs microfluidiques. Les ouvertures sont ensuite percées (Figure II.15D) manuellement. Enfin une étape de capotage est réalisée à l'aide d'un substrat de verre découpé à la taille des dispositifs. Pour cela, une puce en PDMS comportant les canalisations et un substrat de verre, sont traités par plasma O_2 puis mis en contact, permettant ainsi le capotage définitif de la puce.

Cette technique de fabrication, sûre et rapide (moins de 2 heures pour obtenir le moule Si-DF), nous a permis d'exploiter et de renouveler régulièrement et rapidement les nouveaux dispositifs à 100 canalisations secondaires (Figure II.15E).

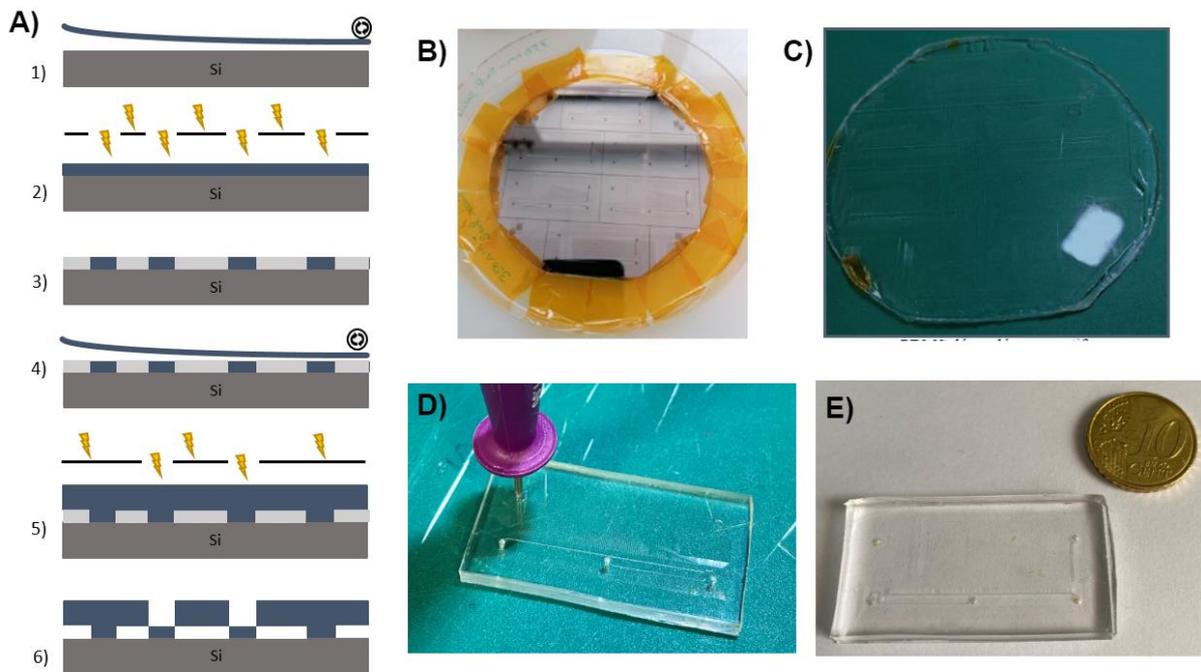


Figure II.15 - Schéma détaillant les étapes de fabrication des dispositifs de tri des puces à 100 canalisations secondaires à l'aide d'un moule Si-DF et de PDMS. A) Sur un substrat de verre, explication des différentes étapes de fabrication des couches DF sur lesquelles sont reportées les canalisations fluidiques. B) Photographie du substrat de verre moulé avec du PDMS. C) Moule PDMS une fois démoulé. D) Puce microfluidique, une fois découpée, pendant le perçage des ouvertures fluidiques à l'aide d'un pointeur. E) Puce finale, après collage du verre pour colmatage.

III. Conclusion

Grâce à l'expertise et aux différentes plateformes disponibles au LAAS-CNRS, la technique utilisant les laminages successifs de couches de films secs nous a permis de faire la preuve de concept à l'aide de nos dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires. La réalisation de ces dispositifs nous permet d'obtenir 14 puces microfluidiques (5 dispositifs de tri avec 1 canalisation secondaires et 9 avec 10 canalisations secondaire) en un temps assez rapide (environ 2 heures, hors découpe). Le passage aux dispositifs à 100 canalisations secondaires nous permet l'obtention de 6 puces microfluidiques par wafer.

La technologie 3D, par laminage de film sec est opérationnelle, comme nous le verrons plus tard. Les dispositifs sont étanches et la filtration semble se dérouler de façon tout à fait correcte. Toutefois, l'aspect visuel des puces, notamment lié aux nombreuses bulles d'air entre les couches, rend leur exploitation délicate. Une solution permettant de lever cette difficulté pourrait être de capoter le dispositif avec seulement, une fine couche de film sec,

puis, lors de l'utilisation, de venir protéger la surface fragile de la puce à l'aide d'une lame de verre recouverte de PDMS, lors de son positionnement dans le support de puce. Cette option n'a pas été mise en œuvre par manque de temps.

Ainsi, les résultats relatifs aux puces à 100 canalisations secondaires qui seront présentés dans les chapitres suivantes ont été obtenus à l'aide des dispositifs en PDMS.

**CHAPITRE III : SEPARATION DE PARTICULES
SUBMICROMETRIQUES PAR FILTRATION
HYDRODYNAMIQUE**

Ce chapitre présente, dans une première partie, les protocoles expérimentaux mis en place pour étudier et caractériser les dispositifs de séparation. Puis nous décrivons le banc expérimental nous permettant de mettre en œuvre les expériences validant le principe de filtration dans les dispositifs microfluidiques à 1, 10 et 100 canalisations secondaires. Dans une seconde partie, nous expliquerons les différentes techniques de caractérisations (TRPS, cytométrie en flux, cellule de Malassez) nous ayant permis d'analyser quantitativement les échantillons avant et après filtration. Enfin, une dernière partie sera consacrée aux différentes améliorations, perspectives réalisables pour de futurs dispositifs et se terminera par une conclusion.

I. Protocole et observation des dispositifs de tri

I.1. Présentation du banc expérimental

Afin de suivre les événements dans les dispositifs, en temps réel, nous avons choisi de visualiser les expériences en microscopie à fluorescence. Pour ce faire, les puces sont positionnées dans un support de puce. Celui-ci est constitué de deux parties. Une partie haute opaque, dans laquelle six ouvertures fluidiques ont été forées, par lesquelles les échantillons seront injectés puis récoltés après filtration. Le support du bas, évidé pour permettre la visualisation des puces, permet de placer correctement la puce avant la fermeture, réversible, avec le support haut. Des joints toriques, positionnés aux niveaux des ouvertures fluidiques, sont utilisés dans le but de rendre la connectique étanche.

Afin de réaliser les différents tests fluidiques, un même banc expérimental a été utilisé pour l'ensemble des dispositifs. Il est composé d'un microscope inversé, de la marque Zeiss, équipé de différents cubes ou filtres adaptés aux fluorochromes utilisés. Ces cubes possèdent chacun un filtre d'excitation permettant de sélectionner la longueur d'onde absorbée par le fluorochrome et d'émission filtrant les radiations émises. Un miroir dichroïque est sélectivement transparent aux radiations émises par l'élément observé.

Ce microscope est équipé d'une source de lumière LED (Andor Lumencor) permettant d'exciter la fluorescence sur une large gamme de longueurs d'ondes. Une source de lumière blanche est également associée au microscope et nous permettra de visualiser la position des canalisations ainsi que les particules non fluorescentes. Dans le but de visualiser, d'acquérir et de traiter les images, une caméra sCMOS est connectée au Zeiss et à un ordinateur. Aussi, dans le but d'injecter les échantillons dans les puces microfluidiques, un générateur de pression (Fluigent MFCS EZ), pouvant aller jusqu'à 1 bar, est utilisé comme schématisé en Figure III.1.

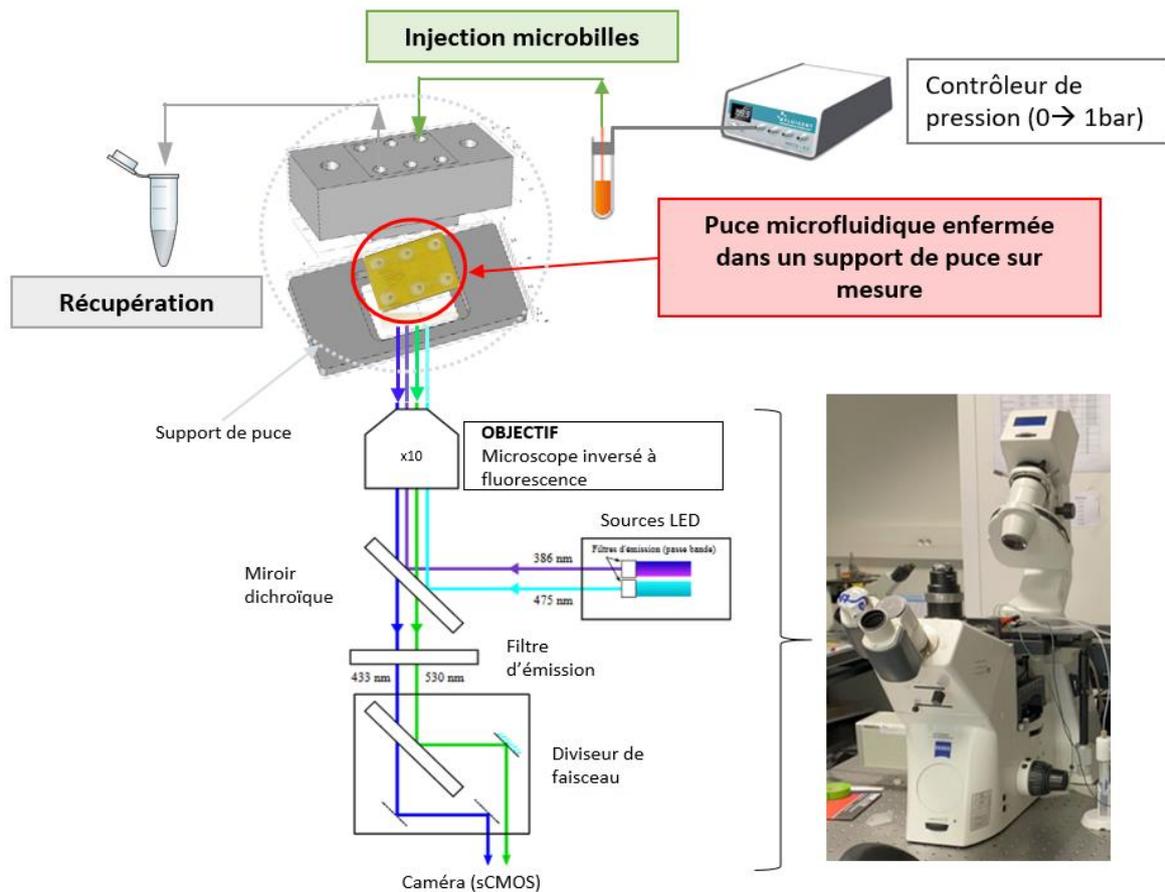


Figure III.1 - Banc expérimental permettant de visualiser les dispositifs fluidiques, en lumière blanche et en fluorescence.

I.2. Préparation des échantillons synthétiques : billes fluorescentes

Dans le but de tester et de valider le rayon de coupure des dispositifs, nous avons choisi d'injecter des solutions synthétiques mimant des solutions plus complexes. Pour cela, nous avons travaillé avec des billes en polystyrène, calibrées et fluorescentes, de différentes tailles (2, 1, 0.5, 0.2 et 0.1 μm) commercialisées par Thermo Fisher Scientific. Des nanoparticules, de chez Microparticles GmbH, en mélanine résine ou en silice, possédant trois diamètres différents (140, 480, 920 nm) et biofonctionnalisées par des protéines (ovalbumine notée OVA ou caséine notée CAS) ont également été utilisées. Ces billes nous ont été fournies par notre partenaire FEMTO-ST, qui a également mis au point leur biofonctionnalisation. Le tableau suivant récapitule les différents paramètres (diamètre, propriétés de fluorescence et concentration) de ces billes.

	NOM	DIAMETRE	BIOFONCTIONNALISATION	COMPOSITION	FLUORESCENCE	% SOLIDE
THERMO FISCHER SCIENTIFIC	F8826	2 µm	-	En polystyrène	580/605 nm	2 %
	F8823	1 µm			505/515 nm	2 %
	F8812	0.5 µm			580/605 nm	2 %
	F8811	0.2 µm			505/515 nm	2 %
	F8801	0.1 µm			580/605 nm	2 %
MICRO PARTICLES GMBH 	NP 920	0.920 µm	-	En mélanine résine (MF-NB-COOH-S1058)	636/686 nm	2.5 %
	NP 480-OVA	0.480 µm	Ovalbumine	En mélanine résine (MF-FITC-COOH-S1014)	506/529 nm	2.5 %
	NP 140-CAS	0.140 µm	Caséine	En silice (SiO ₂ -COOH – AR1061)	-	5 %

Tableau III.1 - Présentation présentant les différentes billes synthétiques et calibrées utilisées durant l'ensemble des expériences menées.

I.3. Tests microfluidiques de validation des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires

Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier le bon rayon de coupure des premiers dispositifs. Ces tests préliminaires, réalisés sur des puces à 1 et 10 canalisations secondaires, s'appuient sur l'utilisation des billes commercialisées chez ThermoFischer [88]. Les billes de diamètre variant entre 2 et 0.1 μm de diamètre, sont diluées dans un tampon, du PBS 1X, nous permettent ainsi de travailler dans des conditions connues et facilement observables.

Avant d'injecter les solutions dans une puce fluidique, cette dernière doit être préalablement préparée. Pour cela, le dispositif est positionné entre les deux parties du support et placé sur la platine du microscope inversé. Un premier remplissage, à l'éthanol, permet de s'assurer de l'étanchéité de la puce mais également d'évacuer l'air présent dans les canalisations. Une fois cette étape réalisée, il est alors possible d'injecter, par l'entrée principale du dispositif, la solution à filtrer. Tout d'abord, l'utilisation d'un mélange simple, c'est-à-dire composé de billes de diamètre supérieur et inférieur au rayon de coupure, est exploitée. Pour cela, le mélange contenant des billes de diamètre 1 et 0.5 μm , c'est-à-dire deux tailles de billes encadrant le rayon de coupure choisi, est utilisé. Les résultats de la filtration de ces billes injectées à 700 mbar sont présentés Figure III.2 et montrent la filtration correcte des billes de 1 μm .

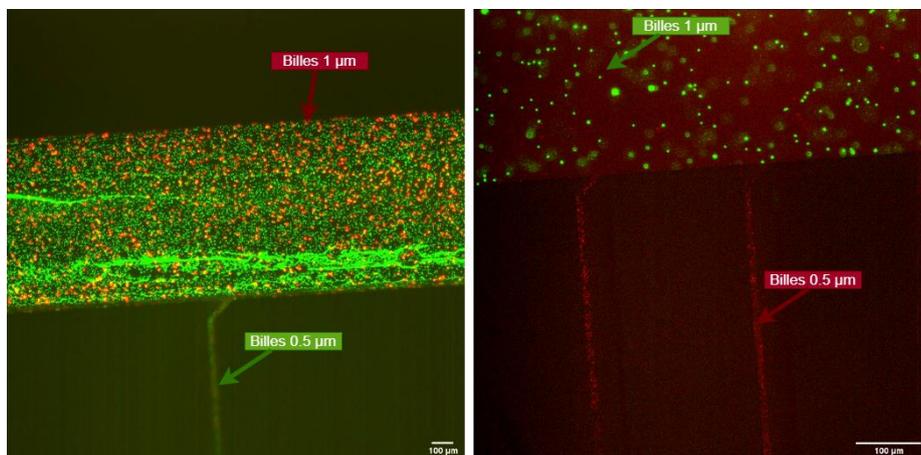


Figure III.2 - Observations, en lumière fluorescente des tests de filtration pour des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires. Les billes de 0.5 μm de diamètre (en vert à gauche et en rouge à droite) sont aspirées dans la (les) canalisation(s) secondaire(s) tandis que celles de 1 μm de diamètre (en rouge à gauche et en vert à droite) restent dans la canalisation principale.

Un mélange de billes de 0.5 μm et 0.2 μm de diamètre, donc de taille inférieure au rayon de coupure, a également été injecté dans un dispositif de tri et la circulation de ces deux tailles de billes a été observée dans le réseau des canalisations secondaires (Figure III.3).

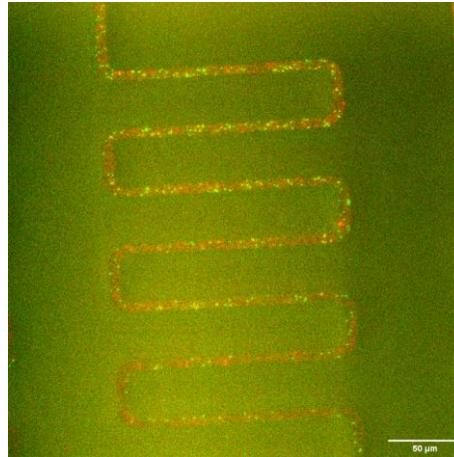


Figure III.3 - Dispositif de tri à 10 canalisations secondaires : aspiration des billes de 0.5 μm (en vert) et 0.2 μm (en rouge) de diamètre dans les canalisations secondaires.

Ces résultats nous permettent de valider qualitativement le principe de filtration pour les dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires possédant un rayon de coupure à 350 nm. Cependant, lors de ces différents tests, nous n'avons pas quantifié le taux de récupération des billes de 0.5 μm de diamètre. En effet, il est à noter que les billes en polystyrène ont tendance à s'agglomérer entre elles formant ainsi de longs réseaux. L'adhérence des billes aux parois des canalisations a également été observée, posant un véritable problème pour la quantification. Pour résoudre cette difficulté, nous avons décidé de prétraiter les puces en injectant, avant les mélanges de billes, une solution de PBS contenant du polymère polyvinylpyrrolidone ou PVP (à 1 %, poids moléculaire 40 kDa), un surfactant (Pluronic) ou de la protéine albumine de sérum bovin (BSA). Dans chaque cas, 30 minutes d'injection de traitement de surface, à faible pression (environ 100 mbar) ont été appliquées, puis leur injection a été stoppée afin que la solution de traitement se dépose sur la surface des parois des canalisations. Malgré l'application de cette étape de traitement des surfaces (différents temps de passage et différentes pressions testés), les billes en polystyrène restent toutefois collées aux canalisations et notamment aux niveaux des canalisations secondaires, malgré des étapes de rinçage au PBS 1X, rendant ainsi la quantification des résultats de filtration impossible.

I.4. Tests microfluidiques sur les dispositifs à 100 canalisations secondaires à l'aide de billes synthétiques

Une fois la validation du principe faite à l'aide de billes synthétiques des dispositifs à 1 et 10 canalisations des expériences fluidiques sur les dispositifs à 100 canalisations secondaires ont été réalisées. Les expériences, proposées dans cette partie, ont été réalisées à partir de puces en PDMS. En effet, l'observation en microscopie à fluorescence des puces fabriquées en films secs et scellées par un capot de verre, est rendue plus délicate.

Pour ces nouveaux dispositifs, le protocole, présenté lors des expériences sur les puces à 1 et 10 canalisations secondaires, est utilisé et permet de confirmer de nouveau, le rayon de coupure des dispositifs. Les résultats obtenus et observés en Figure III.4, sont semblables aux résultats précédemment présentés avec les dispositifs 2D. En effet, une grande quantité de billes de 0.5 μm de diamètre est observée dans le réservoir de sortie secondaire ainsi que quelques billes de 1 μm de diamètre. Comme précédemment, après rinçage du dispositif à l'aide de PBS 1X, nous ne parvenons pas à récupérer l'intégralité des billes filtrées.

Les billes utilisées jusqu'alors étant non fonctionnalisées, l'adhérence sur les parois pourrait être due à des interactions non spécifiques, de nature électrostatique ou hydrophobe. Pour résoudre ce problème, nous avons décidé d'utiliser les nanoparticules fonctionnalisées par notre partenaire de FEMTO-ST, exploitées parallèlement à nos expériences sur le module de capture. L'avantage que présente ces billes, en plus d'être communes au projet, est qu'elles sont biofonctionnalisées par des protéines (biofonctionnalisation des NP 140-CAS par la caséine et NP 480-OVA par ovalbumine) et pourraient, ainsi, lever le verrou lié aux adhésions des billes en polystyrènes observés sur les canalisations.

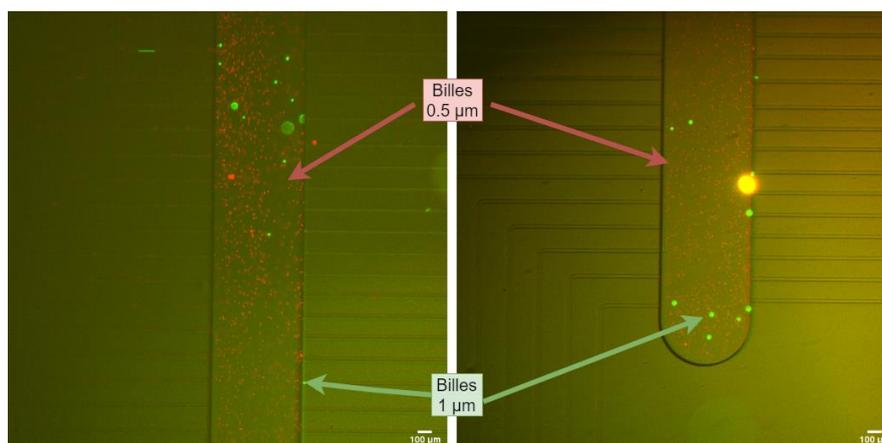


Figure III.4 - Dispositif de tri à 100 canalisations secondaires, observations en fluorescence, du réservoir de sortie secondaire. La filtration montre une récupération en sortie de billes de 0.5 μm en grand nombre et de quelques billes de 1 μm .

Dans le but d'harmoniser nos expériences, du Tween20 [89] à 0.1% est ajouté aux échantillons. Ce dernier est un détergent possédant des propriétés à la fois hydrophile et hydrophobe. Ainsi, lors des nouveaux tests, l'injection de ce nouveau traitement sera appliquée, mais sera également présent dans les mélanges à filtrer. L'ajout du Tween20 et l'utilisation des billes fournies par FEMTO-ST donnent d'excellents résultats : l'interaction aux parois est réduite à un niveau négligeable. Les nouvelles conditions d'utilisation des dispositifs sont données en Annexe III.1 de ce document.

Afin de qualifier la filtration par les dispositifs, nous avons d'abord analysé quantitativement les taux de récupération et de filtration d'échantillons mono disperses. Pour cela, nous avons préparé des solutions contenant une seule gamme de billes (NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920 séparément). Les différents taux sont définis comme suit :

- Le taux de récupération : $\tau_R = \frac{\text{Concentration des particules après filtration}}{\text{Concentration initiale}}$
- Les taux de filtration : $\tau_F = \frac{\text{Concentration initiale} - \text{Concentration des particules après filtration}}{\text{Concentration initiale}}$

Nous nous fixons comme objectif de récolter 35 μL en sortie secondaire du dispositif de tri et nous connaissons le débit théorique de ces dispositifs à 100 canalisations secondaires (0.037 $\mu\text{L/s}$). Ainsi, le volume filtré attendu doit être récolté en 15 minutes environ. Dans le but de récupérer la solution filtrée le plus rapidement possible, un capillaire, court (5 cm de long et 0.5 mm de diamètre interne) est connecté en sortie des canalisations secondaires. Dans cette condition, son volume mort est de l'ordre de 10 μL et seulement 5 minutes sont nécessaires pour le remplir. Ainsi, ceci porte le temps de filtration complet à 20 minutes. La solution filtrée sera, ensuite, récupérée et conditionnée dans un Eppendorf. Aussi, dans le but de récolter un volume suffisamment important pour la réalisation des expériences de quantification et connaissant les temps de filtration, nous avons préparé une solution de 30 mL de solution de PBS-Tween20 dans laquelle les billes sont en suspension.

Pour vérifier le bon fonctionnement du dispositif, le protocole, décrit en Annexe III.2 est appliqué. Dans le cas d'une solution homogène contenant des billes NP 480-OVA, les billes non filtrées sont très rapidement (quelques secondes) présentes dans l'ensemble du réseau des canalisations secondaires et remplissent entièrement le réservoir de sortie secondaire (Figure III.5A). Une fois l'échantillon totalement filtré, une étape de rinçage est réalisée. Pour cela, une solution de PBS-Tween20 est injectée à 1 bar et permet d'éliminer les billes NP 480-OVA encore présentes dans le réservoir de sortie secondaire (Figure III.5B et III.5C). Ainsi, après cette étape de rinçage, la quasi-totalité des billes sont récoltées grâce au capillaire de sortie et conservées pour l'étape d'analyse.

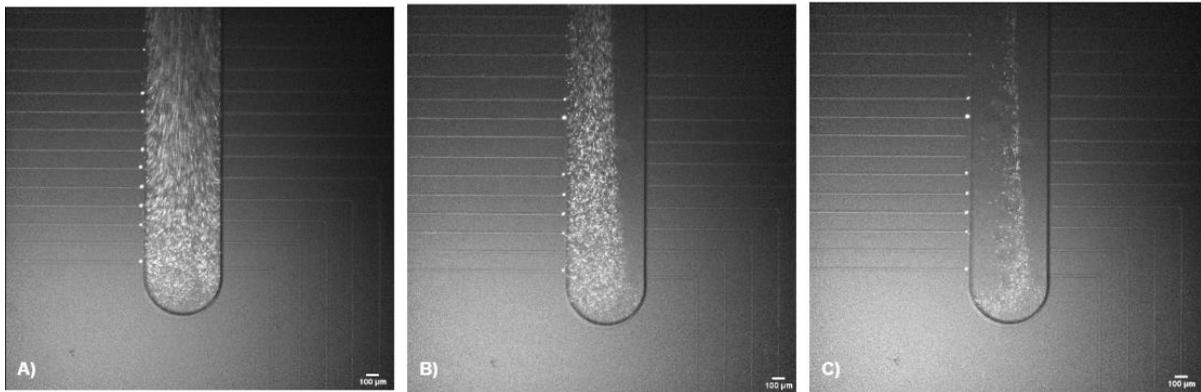


Figure III.5 - Observations du réservoir de sortie secondaire lors des tests de filtration des NP 480-OVA dans un dispositif à 100 canalisations secondaires, en lumière fluorescente. A) Durant la phase d'injection des NP 480-OVA. B) Début de l'étape de rinçage. C) Après plus d'une minute de rinçage.

Une fois la filtration des billes NP 480-OVA faite, une filtration des billes NP 920, c'est-à-dire de diamètre 920 nm et donc supérieure au rayon de coupure, est réalisée en suivant ce même protocole. Lors de l'étape de filtration, nous observons la présence de quelques billes de 920 nm dans le réservoir de sortie des canalisations secondaires (Figure III.6A et III.6B), en moindre proportion toutefois comparée aux billes NP 480-OVA. L'étape de rinçage est nécessaire afin de récupérer l'ensemble des billes non filtrées (Figure III.6C).

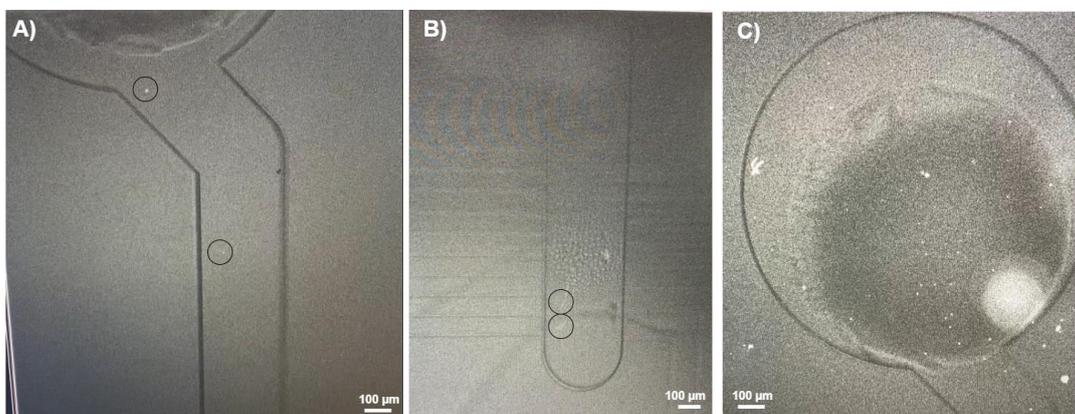


Figure III.6 - Observations des tests de filtration des NP 920 dans le dispositif à 100 canalisations secondaires, lumière fluorescente. A) Durant la phase d'injection, présence de 2 NP 920 dans le réservoir. B) Bas du réservoir, quelques NP 920 sont aspirées dans le réservoir. C) Après l'étape de rinçage.

Cette expérience est répétée avec des billes NP 140-CAS. Cependant, ces billes n'étant pas fluorescentes, il ne nous a pas été possible de suivre la filtration en temps réel. Toutefois, ces billes étant plus petites que le rayon de coupure, nous nous attendons à les retrouver en

grande quantité dans le réservoir de la sortie secondaire. Ainsi, pour savoir si la filtration s'est bien déroulée ou non, seule une analyse quantitative permettra de déterminer le taux de récupération des billes NP 140-CAS.

Dans le but de comparer quantitativement les résultats de filtration, l'ensemble de ces tests a été réalisé dans des conditions expérimentales similaires (pression d'injection en entrée principale de 1 bar) et dans les concentrations indiquées dans le tableau suivant

EXPERIENCES « TAILLE DE BILLE UNIQUE »	CONCENTRATION INJECTEE
TEST 1 – NP 480-OVA	[NPs] = 1.10^8 particules/mL
TEST 2 – NP 920	
TEST 3 – NP 140-CAS	

Tableau III.2 - Information sur les concentrations utilisées lors des expériences utilisant des billes calibrées NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920.

I.5. Étude de la filtration de solutions de billes monodisperses

Afin de caractériser les solutions filtrées, nous avons choisi d'utiliser la technique TRPS (Tunable Repulsive Pulse Sensing) [90]. Les expériences sont réalisées à l'aide de l'instrument qNano (Figure III.7A) industrialisé par Izon Sciences, qui permet les mesures en taille, concentration et charge de surface (non exploitée ici) de nanoparticules en suspension. Son mode de fonctionnement est le suivant : l'échantillon à analyser, dilué dans un électrolyte, est soumis à une pression et une différence de potentiel et est entraîné (Figure III.7B) à travers un nanopore (noté np). Au passage de ce nanopore, les particules, de façon individuelle, modifient l'impédance du nanopore et génèrent un signal de blocage. Le logiciel, qui enregistre les passages, considère que chaque blocage (amplitude et durée) est proportionnellement lié à la taille de la particule. La distribution en taille sera déterminée par la mesure du taux de comptage des nanoparticules. La gamme de détection du qNano est comprise entre 40 nm et 11 300 nm pour des concentrations comprises entre 1.10^{10} particules/mL et 5.10^5 particules/mL. Dans notre cas, la concentration idéale des échantillons à analyser est de l'ordre de 5.10^8 particules/mL.

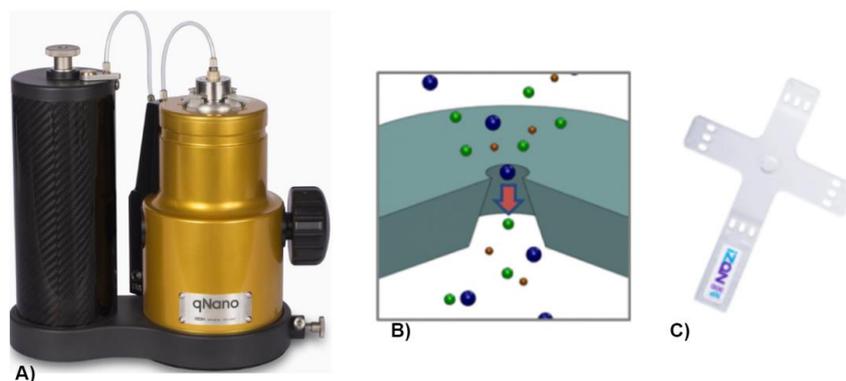


Figure III.7 - Technologie TRPS. A) Module qNano. B) Schéma du principe de la TRPS, passage des particules au travers un nanopore. C) Exemple de nanopore

Pour réaliser les mesures, des nanopores élastomères (Figure III.7C) sont utilisés dans la gamme de taille adaptée aux particules à analyser. Les nanopores np200, np400, np600 et np800 correspondant aux différentes caractérisations à effectuer ont été choisis. Des billes en polystyrène carboxylés fournies par Izon, notées CPC, adaptées à chacun des nanopores, sont également utilisées pour calibrer les mesures. Les différentes caractéristiques sont données dans le tableau ci-dessous.

NANOPORE (np)	GAMME DE TAILLE (NM)	CONCENTRATION (particules/mL)	CALIBRANT (CPC)	MOYENNE (NM)
np 200	85 – 500 nm	$2 \cdot 10^9$	CPC 200	210 nm
np 400	185 – 1 100 nm	$5 \cdot 10^8$	CPC 400	350 nm
np 600	275 – 1 570 nm		CPC 800	810 nm
np 800	385 – 2 050 nm	$1 \cdot 10^8$	CPC 800	

Tableau III.3 – Recommandations d'utilisation (documentation Izon [90]) des différents nanopores (np) utilisés.

Pour chaque analyse la procédure suivante est appliquée. Dans un premier temps, les calibrants sont placés dans un bain à l'ultrason pendant 30 minutes afin de disperser les particules. Lors de la mesure, le nanopore adapté à l'analyse est étiré (mm) et une tension (V) est appliquée. Avant de réaliser les expériences décrites ci-dessous, il a été nécessaire d'identifier les conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire, la taille du pore, son étirement et la tension appliquée. Ce travail, long, fastidieux et sans grand apport méthodologique, ne sera pas décrit dans ce document afin de ne pas en alourdir la lecture. Pour réaliser la mesure, 35 μ L de solution à analyser sont déposées sur le nanopore. Chacune des caractérisations en TRPS présentée dans la suite du document comprend l'analyse des échantillons avant filtration et celle des échantillons filtrés par les dispositifs.

1.5.a. Mesure « témoin »

Dans le but de disposer d'une analyse témoin, nous avons réalisé la filtration d'un échantillon ne contenant aucune bille et avons comparé les résultats obtenus par TRPS sur les échantillons non filtrés et filtrés. Lors des mesures sur un nanopore np800 de l'échantillon non filtré, nous observons (Figure III.8A) un pic centré à 1 090 nm pour une concentration maximale de 3.10^4 particules/mL (concentration totale de $1.9.10^5$ particules/mL). Cette valeur, très faible, est du même ordre de grandeur que le bruit enregistré lors de la mesure. Dans le cas de l'analyse post filtration (Figure III.8B), nous observons une distribution centrée autour de 850 nm pour une concentration maximale de $2.3.10^5$ particules/mL (concentration totale de $1.6.10^6$ particules /mL).

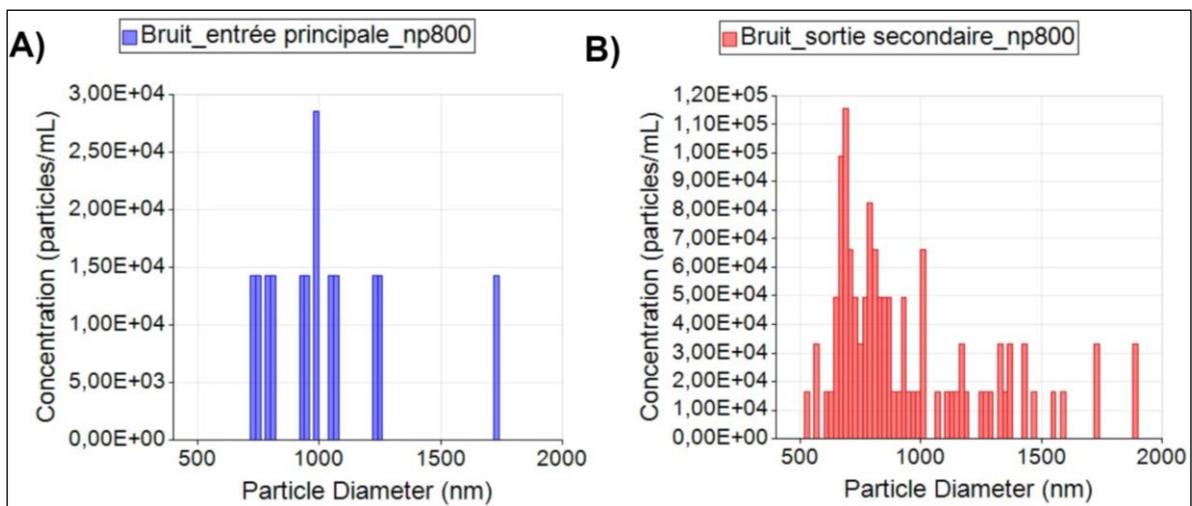


Figure III.8 - Mesure témoin d'un nanopore np800 à l'aide de PBS-Tween20. A) Mesure du PBS-Tween20 injecté dans le dispositif de tri. B) Mesure TRPS de cet échantillon après filtration par notre dispositif.

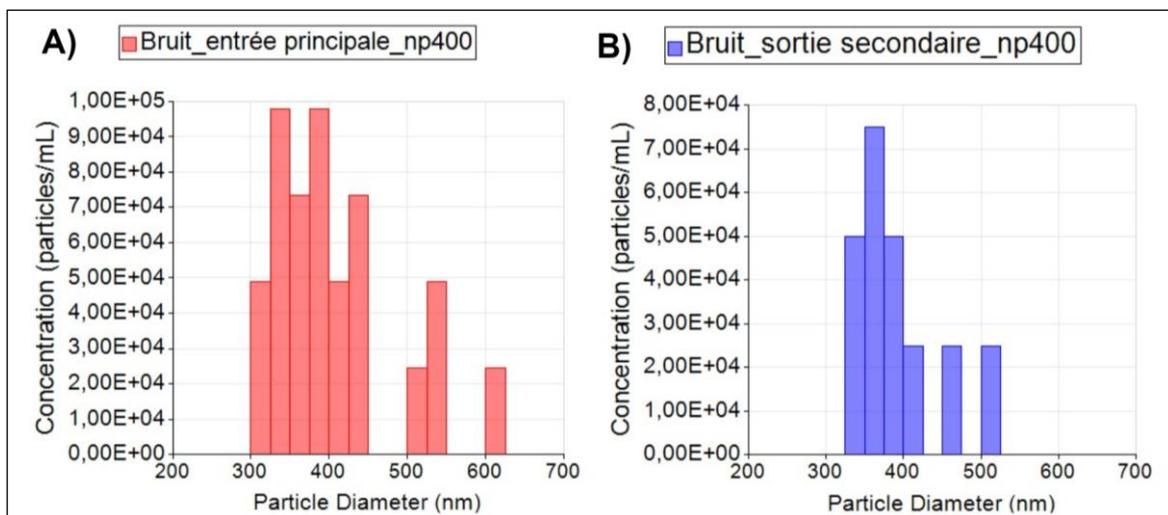


Figure III.9 - Mesure témoin d'un nanopore np400 à l'aide de PBS-Tween20. A) Mesure du PBS-Tween20 injecté dans le dispositif de tri. B) Mesure TRPS de cet échantillon après filtration par notre dispositif.

La même expérience a été renouvelée avec un nanopore np400. Le résultat de l'analyse de la solution de PBS-Tween20 (Figure III.9A), présente une concentration totale de $5.64.10^5$ particules/mL (concentration maximale de $1.2.10^5$ particules/mL) pour un pic centré à 395 nm. Après filtration (Figure III.9B), les résultats semblent peu changés : concentration totale de $2.5.10^5$ particules/mL et pic centré à 395 nm. Ces deux analyses mettent en évidence la présence, dans les différents tracés, des pics produits par le bruit de la mesure. Ces pics sont positionnés autour de la taille des calibrants utilisés dans les mesures. Les concentrations étant très faibles et en limite de détection, nous les considérerons comme des artefacts de mesure. Une fois ces analyses réalisées, la caractérisation des différentes filtrations est possible.

MESURE TEMOIN EN PBS-TWEEN 20		
np800	ECHANTILLON INITIAL	ECHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	$1.9.10^5$ particules/mL	$1.6.10^6$ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	1 090 nm	850 nm

Tableau III.4 - Présentation des résultats obtenus lors des mesures témoin en PBS-Tween 20 sur un nanopore np800.

MESURE TEMOIN EN PBS-TWEEN 20		
np400	ECHANTILLON INITIAL	ECHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	$5.64.10^5$ particules/mL	$2.5.10^5$ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	395 nm	395 nm

Tableau III.5 - Présentation des résultats obtenus lors des mesures témoin en PBS-Tween 20 sur un nanopore np400.

1.5.b. Caractérisation de la filtration des NP 480-OVA

L'analyse TRPS des solutions contenant des particules NP 480-OVA a été réalisée avec un nanopore np400, étiré à 47.01 nm, à une tension de 0.16 V. L'analyse de l'échantillon synthétique, avant filtration, contenant donc des billes de diamètre 480 nm à une concentration de 1.10^8 particules/mL (concentration attendue) est enregistrée. Les expériences de caractérisation ont été réalisées au moins trois fois à l'aide du qNano.

La Figure III.10 montre la distribution en taille et concentration d'un échantillon non filtré pour trois expériences différentes. On constate ainsi un écart important d'une mesure à l'autre. Nous pouvons imaginer deux origines à ces écarts. La première pourrait être la non homogénéité de l'échantillon d'une mesure à l'autre (on prélève 30 μL à l'aide d'une pipette, que l'on dépose sur le nanopore). Aussi, chaque analyse étant réalisée avec un nanopore différent, la deuxième origine pourrait être liée à la mauvaise reproductibilité du perçage des nanopores, celui-ci étant réalisé manuellement. Ainsi, il est très difficile, voire impossible, de faire une moyenne entre plusieurs expériences. Par contre, les analyses de l'échantillon avant et après filtration, sont effectuées avec le même nanopore, ce qui lève la variabilité entre nanopores et nous permet, comme nous le verrons ultérieurement, de comparer l'échantillon avant filtration à celui filtré par les dispositifs fluidiques. Dans les paragraphes qui suivent, nous ne présenterons donc qu'une seule expérience sur une même courbe.

Le résultat de l'analyse de l'échantillon initial de l'expérience 1 est présenté Figure III.11A. Après traitement des données, une taille moyenne de particules est trouvée autour de 455 nm pour une concentration est de $1.91 \cdot 10^8$ particules/mL. Ces résultats sont cohérents avec nos attentes, même si supérieures (quasiment le double) comparées à la concentration attendue de $1 \cdot 10^8$ particules/mL. En appliquant les mêmes conditions de mesure pour l'échantillon récupéré après filtration, la caractérisation peut être obtenue Figure III.11B. Le diamètre moyen est alors de 520 nm tandis que la concentration obtenue après filtration est de $1.96 \cdot 10^8$ particules/mL, très proche de la concentration initiale. Ce résultat indique une récupération complète, malgré une légère hausse de la concentration obtenue après la filtration, de la solution initiale après passage dans le dispositif. Une seconde expérience de filtration contenant des NP 480-OVA a été réalisée. Une fois de plus, les distributions en taille et en concentration, avant et après filtration, ont été obtenues à partir d'un même nanopore np400. L'ensemble des résultats est donné dans le tableau III.6.

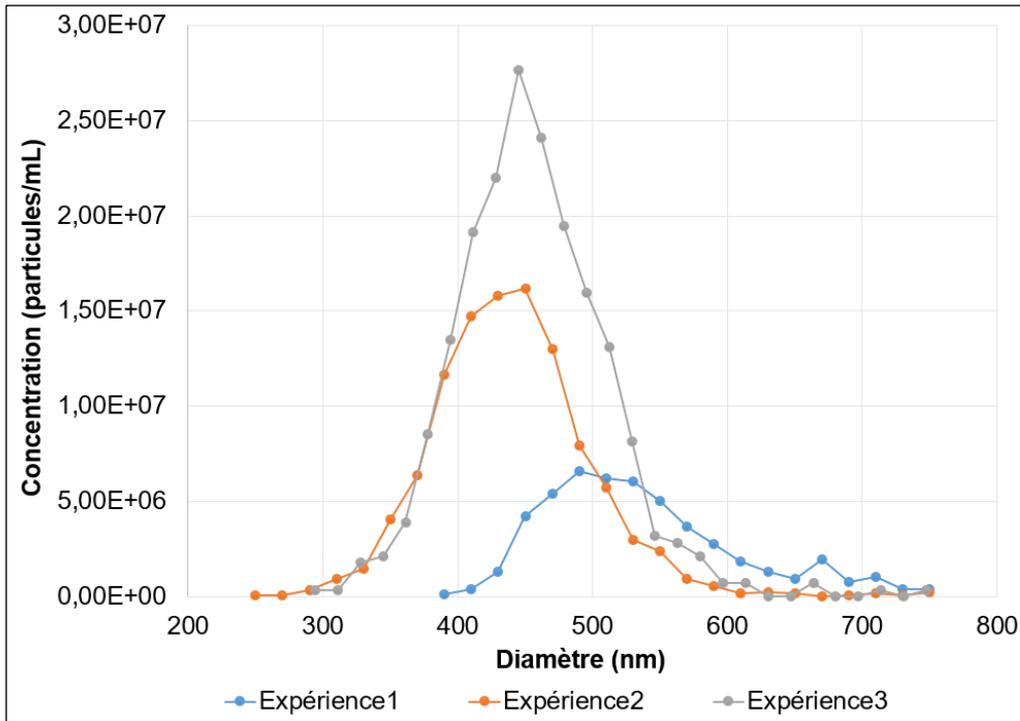


Figure III.10 - Comparaison de la distribution en taille et en concentration de trois expériences de filtration d'un échantillon de NP 480-OVA non filtrées. Chaque distribution a été obtenue à partir d'un nanopore np400 différent.

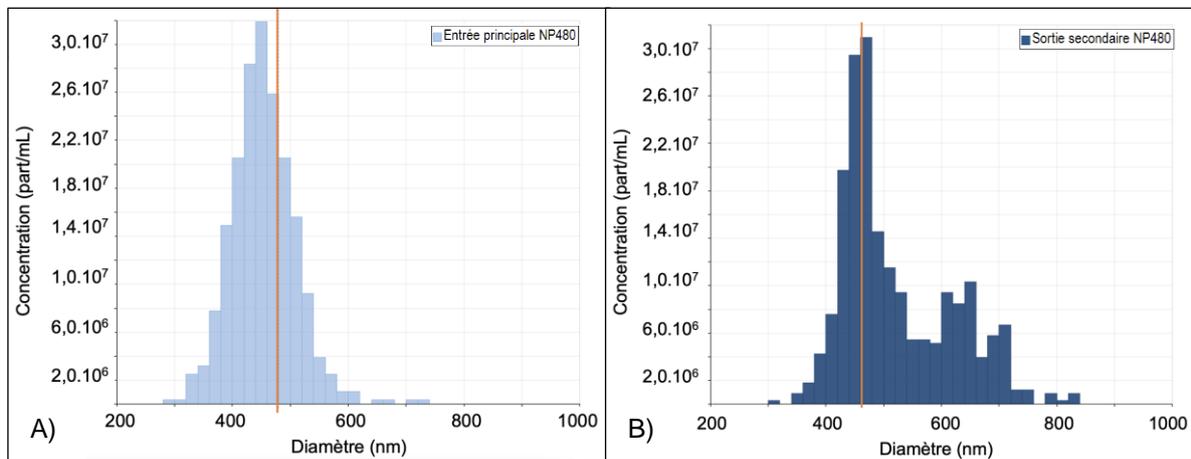


Figure III.11 - Résultat de l'analyse TRPS de la filtration de NP 480-OVA (filtration 1) avec un nanopore np400 et calibrée par des CPC400 (stretch : 47.01 mm et tension : 0.16V), en orange, valeur nominale donnée par le fabricant. A) Distribution en taille de l'échantillon injecté en entrée principale du dispositif. B) Distribution en taille de ce même échantillon filtré.

RÉSULTATS DES FILTRATIONS DE NP 480-OVA SUR np400		
<i>Filtration 1</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1.91.10 ⁸ particules/mL	1.96.10 ⁸ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	455 nm	520 nm
<i>Filtration 2</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1.07.10 ⁸ particules/mL	6,79.10 ⁷ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	470 nm	540 nm

Tableau III.6 - Présentation des concentrations et des diamètres moyens avant et après filtration lors de filtrations de solution contenant des NP 480-OVA. Distributions obtenues à partir de nanopores np400.

Les différents taux de filtration et de récupération pour les expériences de filtration des NP 480-OVA sont donnés dans le tableaux suivant :

	<i>Filtration 1</i>	<i>Filtration 2</i>	Taux de récupération des NP 480-OVA
Taux de filtration T_F	- 2 %	14 %	
Taux de récupération T_R	102 %	86 %	94 % \pm 8 %

Tableau III.7 - Présentation des taux de filtration et de récupération des NP 480-OVA pour les différentes filtrations réalisées.

Cependant, un élargissement de la distribution en taille, de 350 à 750 nm, de l'échantillon après filtration est observé lors de la superposition des deux analyses (Figure III.12). La solution ne possédant qu'une seule taille de billes, nous émettons deux hypothèses sur ce phénomène. La première est la déformation des particules lors de leur écoulement en raison des forces de cisaillement. La seconde est la possible agglomération des billes après filtration.

Pour valider ou infirmer l'une des deux hypothèses, nous avons observé la solution contenant ces billes, disposée sur une lamelle de verre, au MEB (Figure III.13A). Lors de ces observations, aucune bille déformée n'a été trouvée. Cette hypothèse de non déformation a été validée par des analyses AFM (Figure III.13B), nous indiquant une structure intacte des NP 480-OVA après passage dans les dispositifs.

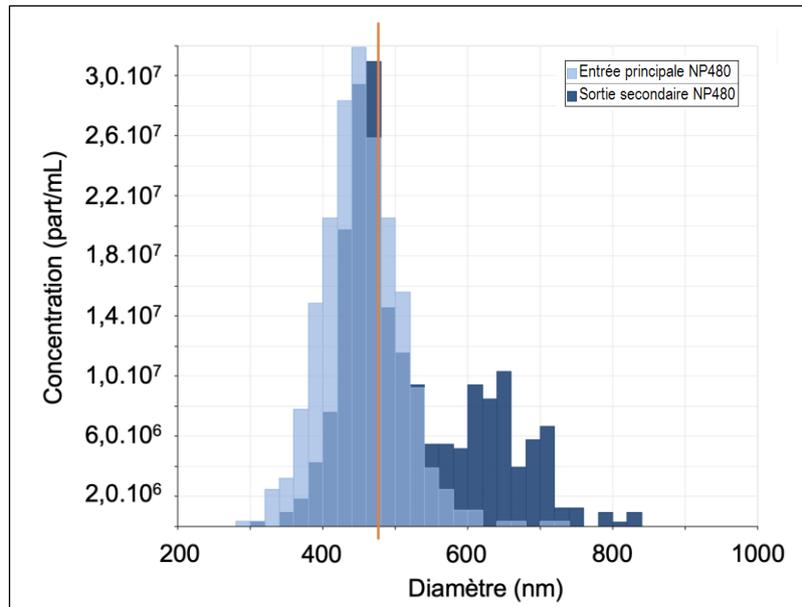


Figure III.12 - Superposition des courbes de distribution obtenues par TRPS de l'échantillon initial NP 480-OVA (bleu clair) et de l'échantillon récupéré après filtration (bleu foncé), lors de la filtration 1. En orange, valeur nominale donnée par le fabricant.

Toutefois, les investigations en microscopie électronique nous ont montré de nombreuses NP 480-OVA agglomérés. En effet, dans le cas d'une suspension n'ayant pas subi d'étape de sonication, ce qui était le cas pour notre analyse MEB mais pas dans le cas de l'analyse AFM où la séparation des individus est bien visible, les NP 480-OVA ont tendance à former des réseaux. Ces observations tendent à confirmer que l'élargissement de la distribution en taille est bien lié à de l'agglomération post-filtration. Ainsi, la filtration semble donc performante.

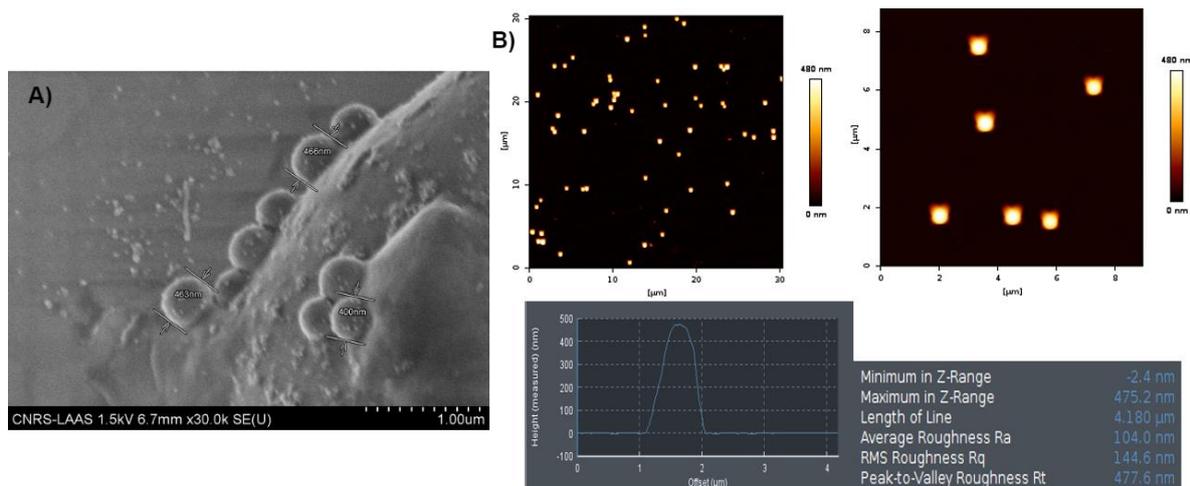


Figure III.13 - Observations des NP 480-OVA ne présentant pas de déformation visible. A) Images MEB des NP 480-OVA issues d'un échantillon filtré. B) Analyse AFM des NP 480-OVA.

1.5.c. Caractérisation de la filtration des NP 920

L'analyse quantitative par TRPS des particules NP 920 a été réalisée en utilisant un nanopore np800, adapté aux billes de diamètre 920 nm, et en appliquant un étirement de 47.01 mm et une tension de 0.10 V. L'expérience de filtration 1 et l'analyse de l'échantillon injecté, dans le dispositif à une concentration attendue de 1.10^8 particules/mL contenant des billes de diamètre 920 nm est illustrée en Figure III.14A. La distribution nous donne une concentration initiale de $6.84.10^7$ particules/mL, plus faible que celle attendue (environ 1.5 fois), et un diamètre moyen de 914 nm. Puis, en appliquant les mêmes conditions expérimentales, nous analysons l'échantillon récupéré après filtration. Sa distribution est représentée Figure III.14B. Après traitement, nous obtenons une concentration après filtration de $1.39.10^6$ particules/mL et une taille moyenne de 974 nm.

Dans le but de vérifier le bon fonctionnement des dispositifs, plusieurs filtrations de NP 920 ont été réalisées et les différents résultats, avant et après filtration, sont donnés dans le tableau suivant.

RÉSULTATS DES FILTRATIONS DE NP 920 SUR np800		
<i>Filtration 1</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	6.84.10 ⁷ particules/mL	1.39.10 ⁶ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	914 nm	974 nm
<i>Filtration 2</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1,13.10 ⁸ particules/mL	6,79.10 ⁷ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	920 nm	870 nm
<i>Filtration 3</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1,12.10 ⁸ particules/mL	2,78.10 ⁷ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	900 nm	730 nm

Tableau III.8 - Présentation des concentrations et des diamètres moyens avant et après filtration lors de filtrations de solution contenant des NP 920. Distributions obtenues à partir de nanopores np800.

Pour chaque expérience de filtration de NP 920, les différents taux de filtration et de récupération ont été calculés et sont donnés dans le tableau III.9.

	Filtration 1	Filtration 2	Filtration 3	Taux de filtration des NP 920
Taux de filtration T_F	98 %	96 %	75 %	
Taux de récupération T_R	2 %	4 %	25 %	89 % \pm 10 %

Tableau III.9 - Présentation des taux de filtration et de récupération des NP 920 pour les différentes filtrations réalisées.

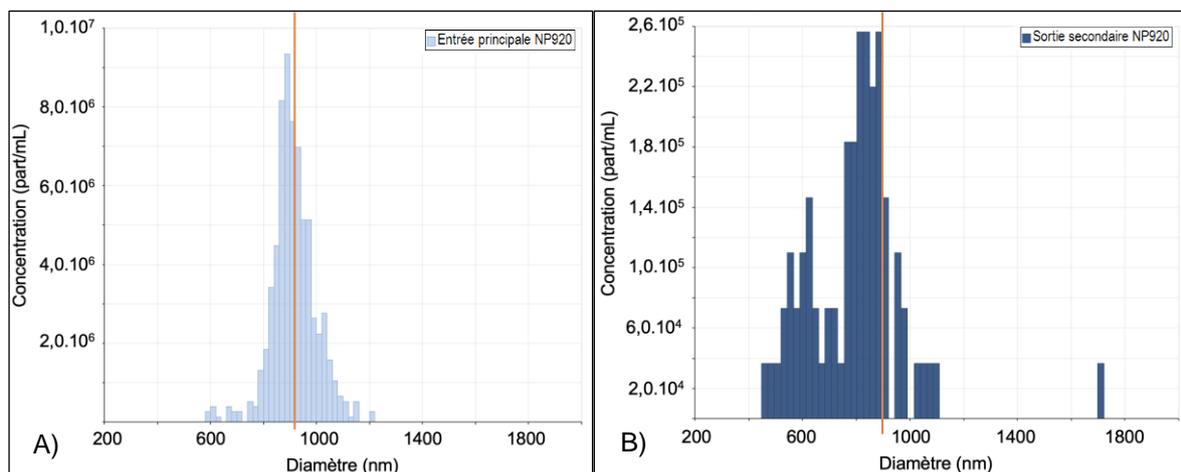


Figure III.14 - Résultat de l'analyse TRPS de la filtration de NP 920 (filtration 1) avec un nanopore np800 et calibrée par des CPC800 (stretch : 47.01 mm et tension : 0.10V), en orange, valeur nominale donnée par le fabricant. A) Distribution en taille de l'échantillon injecté en entrée principale du dispositif. B) Distribution en taille de ce même échantillon filtré.

En superposant les distributions obtenues pour l'analyse en entrée principale et en sortie secondaire (Figure III.15) lors de l'expérience 1, nous pouvons observer une coupure nette aux alentours de 900 nm et une diminution significative de la concentration en NP 920. Bien que nous observions une diminution importante de la concentration, nous pouvons constater un pic résiduel entre 800 et 1 000 nm. En comparant au tracé de l'analyse témoin, sans bille donc et pour un nanopore np800, nous observons des concentrations du même ordre de grandeur, centrées sur la taille du calibrant utilisé. Nous pouvons donc penser qu'il s'agit essentiellement de bruit de mesure, même si, visuellement, nous avons observé la présence de billes NP 920 dans le réservoir de sortie secondaire.

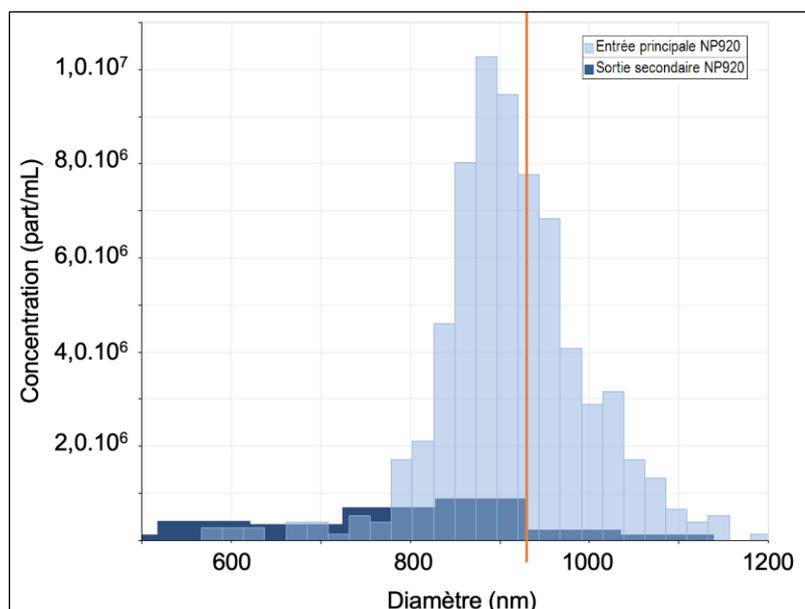


Figure III.15 - Superposition des courbes de distribution obtenues par TRPS de l'échantillon initial de NP 920 (bleu clair) et de l'échantillon récupéré après filtration (bleu foncé), lors de la filtration 1. En orange, valeur nominale donnée par le fabricant.

I.5.d. Caractérisation de la filtration des NP 140-CAS

Pour cette mesure TRPS, le choix du nanopore np200 a été fait selon sa compatibilité avec la taille de bille présente. L'étirement et la tension appliqués sont de 47.07 nm et 0.44 V. L'analyse de l'échantillon initial, lors de la filtration 1, est présentée Figure III.16A. Nous trouvons une concentration initiale de $1.99.10^8$ particules/mL (double de la concentration attendue) pour une taille moyenne de 133 nm. Lors de l'analyse de l'échantillon récupéré en sortie secondaire du dispositif de tri, le résultat présenté en Figure III.16B, montre une similitude dans les distributions en taille et en concentration. En effet, la concentration, après filtration, est identique à celle initiale tandis que le diamètre moyen est légèrement supérieur. Le tableau III.10 donne les distributions en taille et en concentration des différentes filtrations réalisées à partir d'échantillon contenant des NP 140-CAS.

RÉSULTATS DES FILTRATIONS DE NP 140-CAS SUR np200		
<i>Filtration 1</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1.99.10 ⁸ particules/mL	1.99.10 ⁸ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	133 nm	143 nm
<i>Filtration 2</i>	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	2,64.10 ⁸ particules/mL	1,98.10 ⁸ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	140 nm	150 nm

Tableau III.10 - Présentation des concentrations et des diamètres moyens avant et après filtration lors de filtrations de solution contenant des NP 140-CAS. Distributions obtenues à partir de nanopores np200.

A partir des résultats obtenus avant et après filtration, les taux de filtration et de récupération des NP 140-CAS ont été calculés et sont donnés dans le tableaux suivant :

	<i>Filtration 1</i>	<i>Filtration 2</i>	Taux de récupération des NP
Taux de filtration T_F	0 %	25 %	480-OVA
Taux de récupération T_R	100 %	75 %	87 % \pm 12 %

Tableau III.11 - Présentation des taux de filtration et de récupération des NP 140-CAS pour les différentes filtrations réalisées.

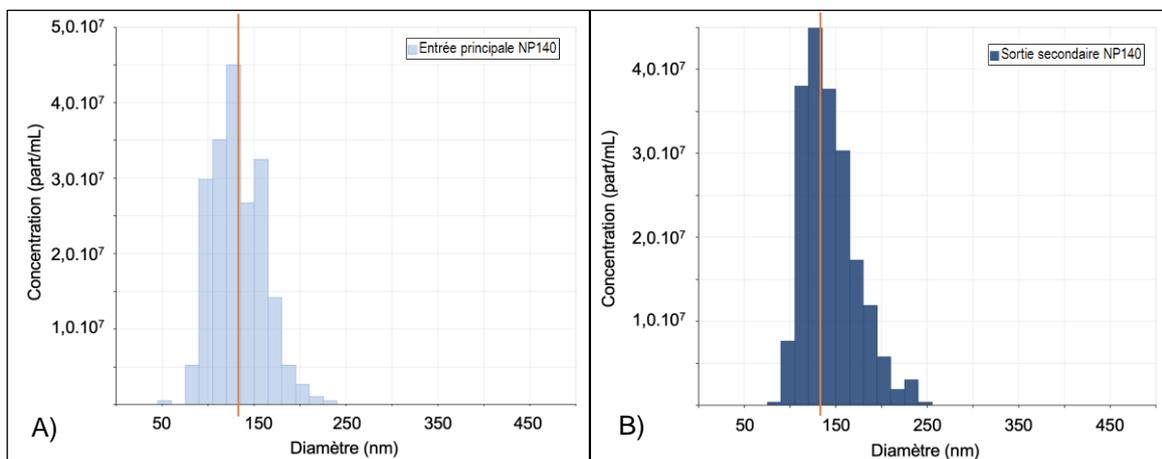


Figure III.16 - Résultat de l'analyse TRPS de la filtration 1 de NP 140-CAS avec un nanopore NP200 et calibrée par des CPC200 (stretch : 47.01 mm et tension : 0.44V), en orange, valeur nominale donnée par le fabricant. A) Distribution en taille de l'échantillon injecté en entrée principale du dispositif. B) Distribution en taille de ce même échantillon filtré.

La superposition des deux histogrammes, donnée Figure III.17, met en évidence la similarité des résultats.

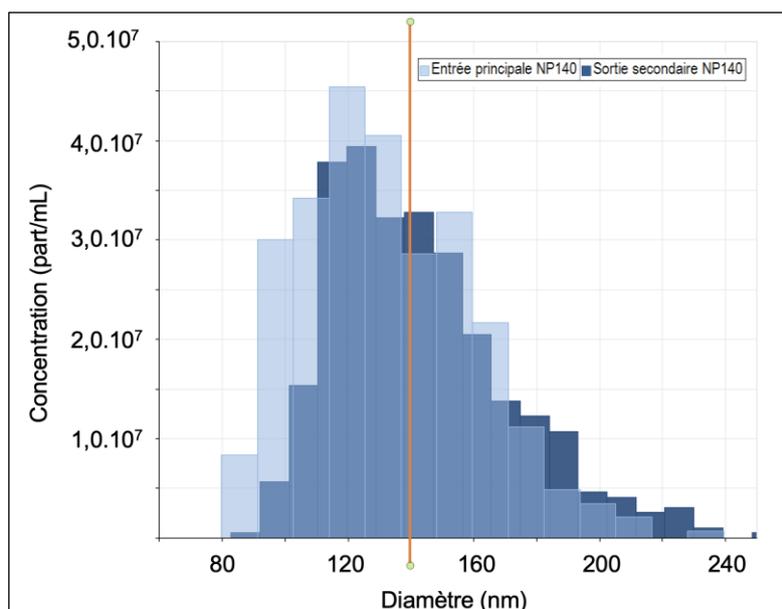


Figure III.17 - Superposition des courbes de distribution obtenues par TRPS, lors de la filtration 1, de l'échantillon initial de NP 140-CAS (bleu clair) et de l'échantillon récupéré après filtration (bleu foncé). En orange, valeur nominale donnée par le fabricant.

I.6. Filtration de mélanges de billes synthétiques

Pour effectuer ce travail, nous avons sélectionné différents mélanges donnés dans le tableau ci-dessous et nous avons privilégié des solutions dont la concentration en particules sub-rayon critique est bien supérieure aux autres.

EXPERIENCES « MELANGE »	CONCENTRATION INJECTEE	CONCENTRATION INJECTEE
MELANGE 1 NP 480-OVA ET NP 920	[480] = $9.9 \cdot 10^7$ particules/mL	[920] = $1.9 \cdot 10^7$ particules/mL
MELANGE 2 NP 140-CAS ET NP 920	[140] = $2.9 \cdot 10^8$ particules/mL	[920] = $1.9 \cdot 10^7$ particules/mL

Tableau III.12 – Concentrations des NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920 utilisées lors des expériences « mélanges ».

I.7. Caractérisation des mélanges de billes synthétiques

I.7.a. Mélange 1 : NP 480-OVA et NP 920

Une analyse TRPS de la solution composée de NP 480-OVA et de NP 920 à des concentrations différentes est réalisée. Pour déterminer leur concentration et leur taille, le choix s'est porté sur le nanopore np800, couvrant la gamme de taille des billes de 480 nm et 920 nm de diamètre. Toutefois, ce nanopore semble être dans la limite basse de détection des petites particules contrairement aux grandes tailles de particules. Il aurait été possible de réaliser l'analyse avec un nanopore np400, utilisable entre 185 nm et 1 100 nm. En effet, celui-ci semble plus adapté à l'analyse des particules de taille proche des NP 480-OVA, mais présente un risque de bouchage non négligeable par les NP 920.

Afin de réaliser les mesures, un étirement de 45.24 nm et une tension de 0.26 V est appliqué sur ce nanopore np800. L'enregistrement de l'échantillon avant filtration est présenté Figure III.18A. La présence de deux distributions bien distinctes est observable : l'une entre 300 nm et 500 nm et l'autre entre 560 et 780 nm. Ce dernier pic, correspondant aux billes de 920 nm de diamètre est centré autour de 680 nm, soit bien plus bas que la taille attendue des NP 920. Concernant la distribution des billes NP 480-OVA, le décalage semble moins prononcé et le pic se situe aux alentours de 400 nm. Pour connaître les concentrations respectives des NP 480-OVA et NP 920, une intégration des deux distributions est effectuée. Ainsi, dans le premier cas, la concentration des NP 480-OVA, comprise entre 300 et 500 nm, est calculée à $1.73 \cdot 10^8$ particules/mL, soit une concentration 73 % supérieure à celle attendue. Aussi, nous faisons de même pour les concentrations comprises entre 560 et 780 nm et nous calculons une concentration des NP 920 de $6.66 \cdot 10^7$ particules/mL, soit plus de trois fois la concentration initiale. Ces premières mesures font apparaître une grande difficulté à obtenir une analyse fiable lorsque deux espèces, de tailles très différentes, sont présentes dans la solution.

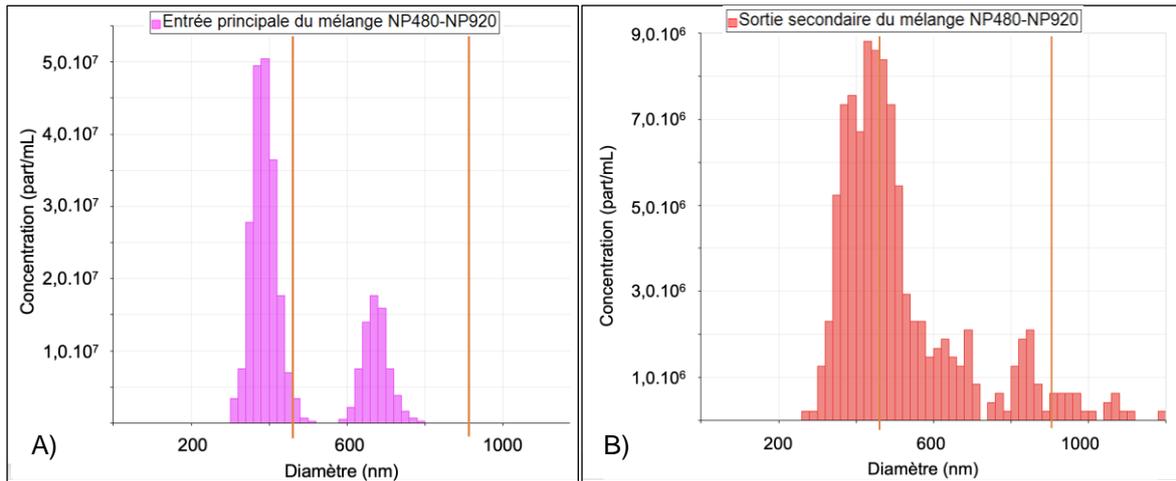


Figure III.18 - Résultat de l'analyse TRPS d'un mélange de NP 480-OVA et NP 920 avec un nanopore np800 et calibrée par des CPC800 (stretch : 45.24 mm et tension : 0.26 V), en orange, valeur nominale donnée par le fabricant. A) Distribution en taille de l'échantillon injecté en entrée principale du dispositif. B) Distribution en taille de ce même échantillon filtré

La composition de l'échantillon filtré est présentée Figure III.18B. Nous nous attendons à retrouver un pic autour de 480 nm, montrant la présence des billes NP 480-OVA après la filtration dans le dispositif et un pic de moindre importance, à 920 nm. Deux pics bien sont observés : un pic large entre 250 nm et 750 nm (Figure III.19A) et un second pic (Figure III.19B), de moindre amplitude, entre 750 et 1 100 nm. Comme observé lors de l'analyse de l'échantillon mono disperse, la distribution correspondant aux billes NP 480-OVA est sensiblement élargie vers les tailles supérieures. En effet, nous obtenons une distribution comprise entre 250 et 750 nm, très comparable à l'élargissement observé pour la filtration des billes NP 480-OVA seules (Figure III.12B). Afin de déterminer la concentration de ces deux distributions, nous intégrons, dans un premier temps, les concentrations comprises entre 250 et 750 nm. La concentration après filtration calculée est de $8.81.10^7$ particules/mL, soit une perte de 50 % par rapport à la concentration initiale (Figure III.18A). Pour la seconde distribution, présente entre 750 et 1100 nm, la concentration après filtration calculée est de l'ordre de $2.94.10^6$ particules/mL. Ceci correspondant à une filtration de 96 %. Toutefois, nous pouvons voir qu'une grande partie des pics sont à une concentration inférieure à 1.10^6 particules/mL et donc proche du bruit de fond observé lors de l'analyse témoin.

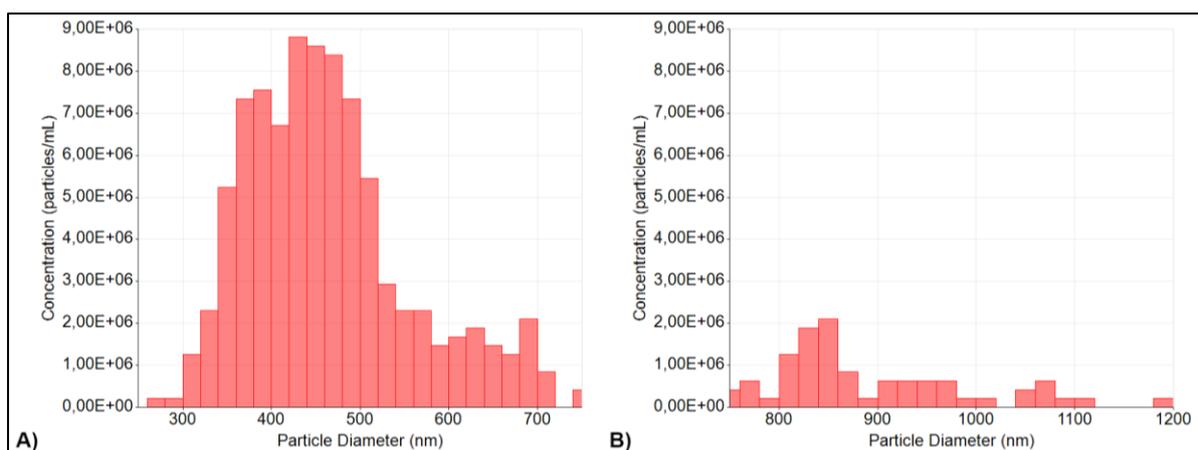


Figure III.19 - Zoom sur la courbe de distribution de l'analyse TRPS d'un mélange de NP 480-OVA et NP 920. A) Distribution en taille de l'échantillon filtré entre 250 nm et 750 nm. B) Distribution en taille de l'échantillon filtré entre 750 nm et 1200 nm.

RÉSULTATS DE FILTRATION DU MÉLANGE 1		
CONCENTRATION	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
NP 480-OVA	1.73.10 ⁸ particules/mL	8.81.10 ⁷ particules/mL
NP 920	6.66.10 ⁷ particules/mL	2.94.10 ⁶ particules/mL
DIAMETRE MOYEN	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
NP 480-OVA	400 nm	500 nm
NP 920	670 nm	925 nm

Tableau III.13 - Tableau récapitulatif de la caractérisation d'un mélange NP 480-OVA et NP 920 avant et après filtration.

Les taux de récupération et de filtration des NP 480-OVA et NP 920, calculés à partir des concentrations obtenues lors des mesures en TRPS sont données dans le tableau suivant :

	NP 480-OVA	NP 920
Taux de filtration T_F	50 %	96 %
Taux de récupération T_R	50 %	4 %

Tableau III.14 - Taux de récupération et de filtration des NP 480-OVA et NP 920, dans un mélange contenant les deux types de NPs.

Une superposition des distributions avant et après filtration est présentée en Figure III.20. Deux points sont importants à souligner. Pour cet échantillon, contenant deux populations de taille bien distinctes et possédant, toutes les deux, des concentrations élevées, un fort décalage de la position des distributions est observé. Nous pouvons donc en déduire, que

cette mesure TRPS, en présence de deux populations ayant des tailles bien différentes et des concentrations comparables est faussée : le pic des particules les plus grosses est sensiblement décalé vers des tailles inférieures tandis que les concentrations s'écartent de leur valeur nominale.

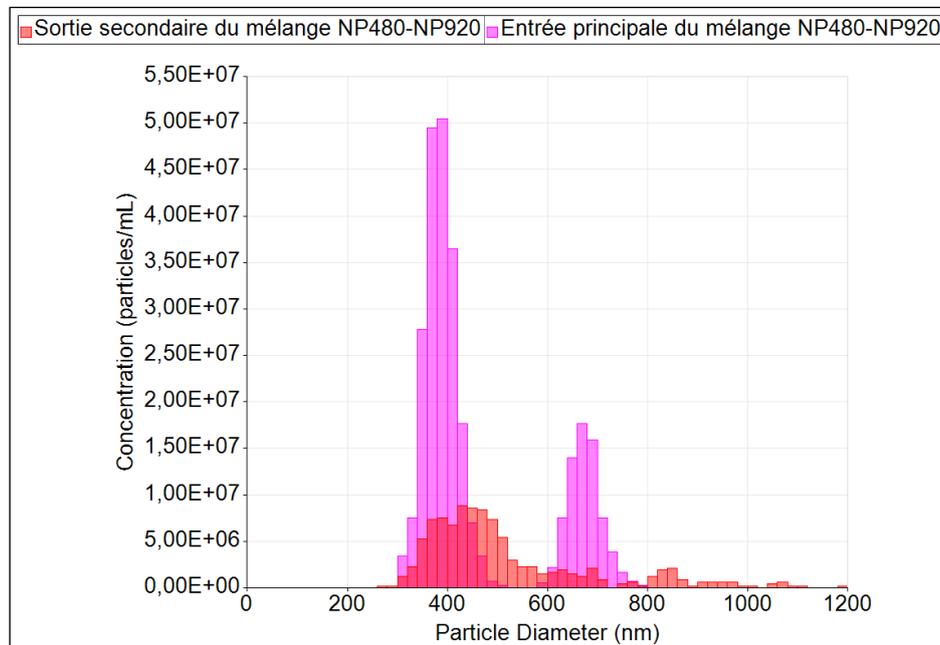


Figure III.20 - Superposition des courbes de distribution obtenues par TRPS de l'échantillon initial du mélange NP 480-OVA et NP 920 (violet) et de l'échantillon récupéré après filtration (rouge).

1.7.b. Mélange 2 : NP 140-CAS et NP 920

Afin d'approfondir les caractérisations des dispositifs, une caractérisation d'un mélange contenant des particules NP 140-CAS à une concentration de $2.9 \cdot 10^8$ particules/mL et NP 920 à $1.9 \cdot 10^7$ particules/mL a été envisagée. Notre première question s'est portée sur le choix du nanopore à utiliser. En effet, aucun nanopore n'est adapté à l'analyse de particules de tailles si éloignées. Une mesure à l'aide d'un nanopore np400 (couvrant une gamme de taille entre 185 et 1 100 nm) a toutefois été réalisée. Cependant, aucune analyse de l'échantillon de départ n'a pu aboutir. L'analyse de l'échantillon filtré, c'est à dire composé essentiellement de NP 140-CAS, ne donne cependant pas de résultat convaincant non plus. (Figure III.21).

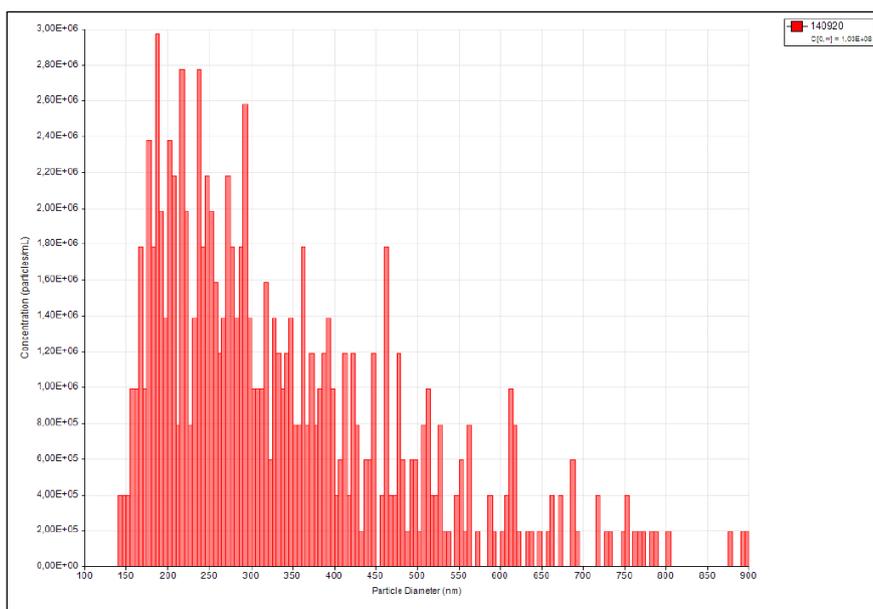


Figure III.21- Résultat de l'analyse TRPS d'un mélange de NP 140-CAS et NP 920 avec un nanopore np400 et calibrée par des CPC400 (stretch : 45 mm et tension : 0.26 V).

De nombreuses difficultés de mesure ont été rencontrés dans le cas de solutions hétérogènes en taille et en concentration. En effet, dans le cas où une population semble être prédominante sur l'autre, notamment en termes de concentration, l'analyse finale paraît tout à fait correcte tandis qu'en présence de deux populations, présentant toutes les deux une forte concentration, l'analyse TRPS semble produire des résultats erronés. En effet, comme observé Figure III.18A, non seulement les distributions en taille sont décalées mais les concentrations sont très différentes de celles attendues. Or, après filtration, Figure III.18B, c'est-à-dire après l'élimination en grande partie des NP 920, la distribution en taille des NP 480-OVA se rapproche de celle souhaitée et devient comparable à celle obtenue dans le cas de la filtration de ces NPs seuls. De plus, pour l'analyse de particules ayant des tailles très éloignées (ce qui est notre cas pour l'analyse des NP 140-CAS et NP 920), la caractérisation en TRPS ne semble pas adaptée du fait, notamment, des choix des nanopores limitant la gamme de taille de l'étude.

1.8. Interprétations des résultats

L'ensemble des analyses TRPS réalisé nous a permis de déterminer les distributions en taille et en concentration dans le cas de solutions homogènes contenant un seul type de NPs (NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920). Dans ces trois cas, les résultats montrent des profils de distribution corrects et nous pouvons confirmer, grâce à l'analyse avant et post filtration des NP 920, le bon fonctionnement des dispositifs de tri. Nous notons toutefois, une déformation de la distribution, pour les billes NP 480-OVA, après passage dans les puces. En effet, la taille

centrée à 480 nm avant filtration semble, après filtration, être présent autour de 550 nm. Nous avons cherché à comprendre les origines de cet étalement. Comme nous l'avons vu, nous pensons que l'élargissement de la distribution est dû à de l'agglomération post filtration. Nous pouvons conclure de ces résultats, que la filtration est efficace et que la concentration des petites billes, dans le filtrat, est identique à la concentration initiale.

Toutefois, la présence de quelques billes NP 920 dans le filtrat nous a amené à réexaminer les causes possibles d'un défaut de filtration. En particulier, nous avons réexaminé l'approximation du profil parabolique et avons recalculé les rapports Q^* , en utilisant les profils de vitesse exacts. Nous avons ainsi comparé les valeurs Q^* exactes avec celles obtenues par approximation parabolique. Nous avons cherché à évaluer l'erreur engendrée sur le rayon de coupure (Figure III.22). Pour cela, nous avons dans un premier temps, déterminé le Q^* dans le cas des valeurs de profils exacts, pour différents rayons de coupure (100, 200, 300, 400 et 500 nm) et avons obtenu le tracé bleu. Puis nous les avons comparés aux Q^* obtenus avec l'approximation du profil parabolique (en orange).

La valeur de Q^* obtenue lors des calculs conduisant à la conception des dispositifs et étant de l'ordre de 3.10^{-5} , nous pouvons noter une différence importante dans la valeur du rayon de coupure correspondant. En effet, l'approximation parabolique tendrait à une sur estimation du rapport Q^* pour un rayon de coupure donné. Ainsi, dans notre cas, le rayon de coupure fixé théoriquement à $R_c = 350$ nm est réévalué à $R_c = 450$ nm. Cet écart, non négligeable, peut expliquer la présence de quelques billes de diamètre 920 nm dans le réservoir de la canalisation secondaire.

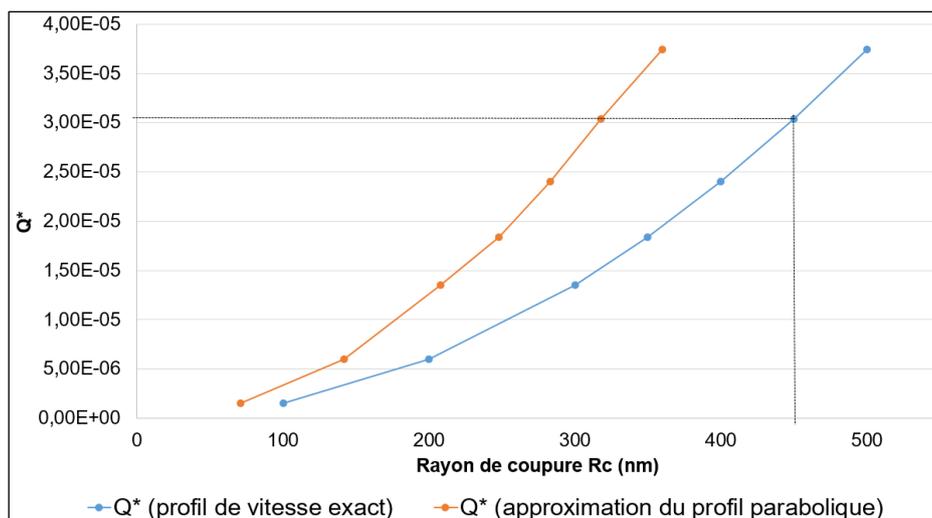


Figure III.22 Comparaison des rayons de coupure selon la valeur du Q^* obtenue par approximation du profil parabolique (en orange) et obtenue avec les profils de vitesse exacte (bleu).

Une autre hypothèse pouvant expliquer la présence de billes NP 920 dans le filtrat est lié à la diffusion thermique. En effet, lors de leur passage au niveau de l'intersection entre la canalisation principale et les canalisations secondaires, les particules peuvent, par diffusion thermique, pénétrer dans les canalisations secondaires. Nous avons alors calculé le coefficient de diffusion (Figure III.23A) des particules, dans la solution, donnée par la relation de Stokes-Einstein-Sutherland (équation III.1).

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R} \quad (\text{III. 1})$$

Aussi, selon Fouet et al. [84] la diffusion thermique (Figure III.23B) induit un écart sur le rayon de coupure décrit par la relation (III.2). Ces écarts sont principalement liés au rayon de la particule (R), la largeur de la canalisation secondaire (w_{Lat}), au gradient de pression appliqué ∇P et de la hauteur de la canalisation (h).

$$\Delta r = \sqrt{\frac{2 \cdot k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot R^2} \cdot \frac{w_{\text{Lat}}}{\nabla P \cdot h}} \quad (\text{III. 2})$$

Comme le montre la Figure III.23, dans le cas d'un rayon de coupure à 350 nm, l'erreur associée est de 15 nm et de 50 nm pour un rayon de coupure de 100 nm.

Enfin, la dernière hypothèse est liée à la géométrie des canalisations. En effet, il avait été démontré, également par M. Fouet, que la séparatrice n'est pas parallèle à la paroi de la canalisation sur toute sa hauteur, en raison de l'influence des parois inférieures et supérieures de la canalisation. Comme illustré sur la Figure III.24, les simulations montrent que le rayon de coupure est plus élevé dans les coins. Dans le cas présenté dans cette même figure ($R_c = 250$ nm et $h = 10$ μm), le rayon critique maximal (R_{max}) peut atteindre 403 nm, soit presque deux fois la valeur nominale et le flux associé correspondant à 16% du débit de la canalisation secondaire. Dans notre cas, la hauteur h étant supérieure à la largeur w , on peut penser que le flux provenant des zones de coin sera bien inférieure à ces 16 %. Une simulation précise aurait été nécessaire pour déterminer, à la fois, le rayon critique maximal et le flux correspondant. Quoi qu'il en soit, on peut imaginer que ce phénomène contribue à la présence de NP 920 dans le filtrat.

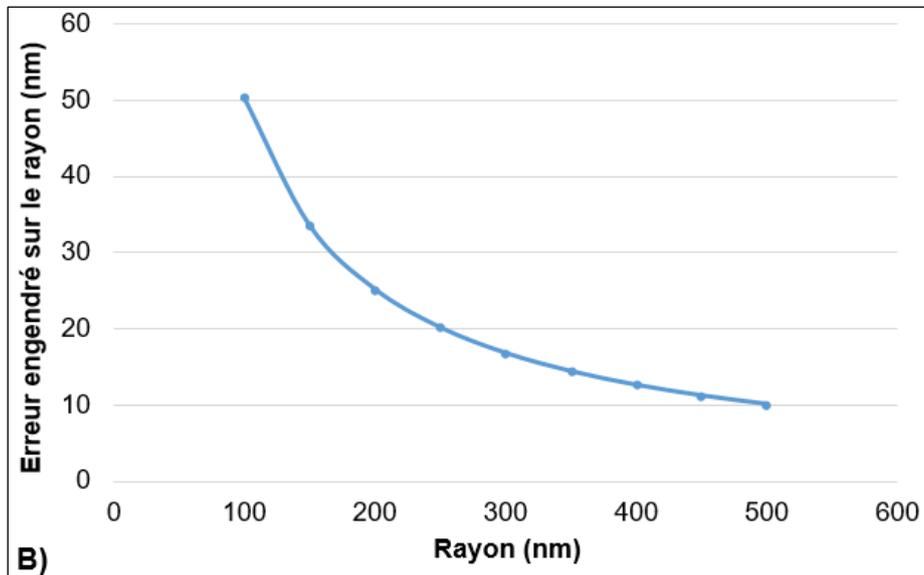
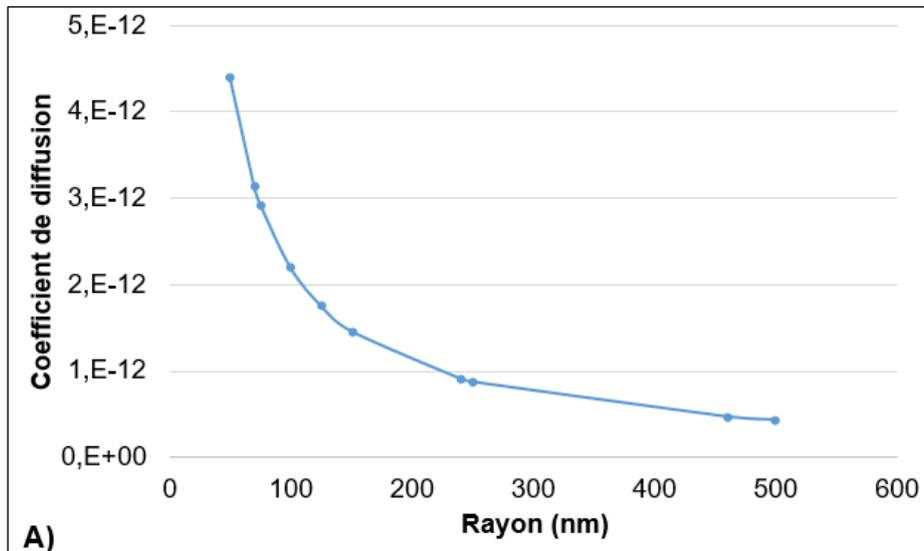


Figure III.23 - Étude des incertitudes liées à des phénomènes de diffusion A). Tracé des coefficients de diffusion des particules en fonction du rayon de celles-ci. B) Tracé de l'erreur induit sur le rayon de coupure selon la taille des particules.

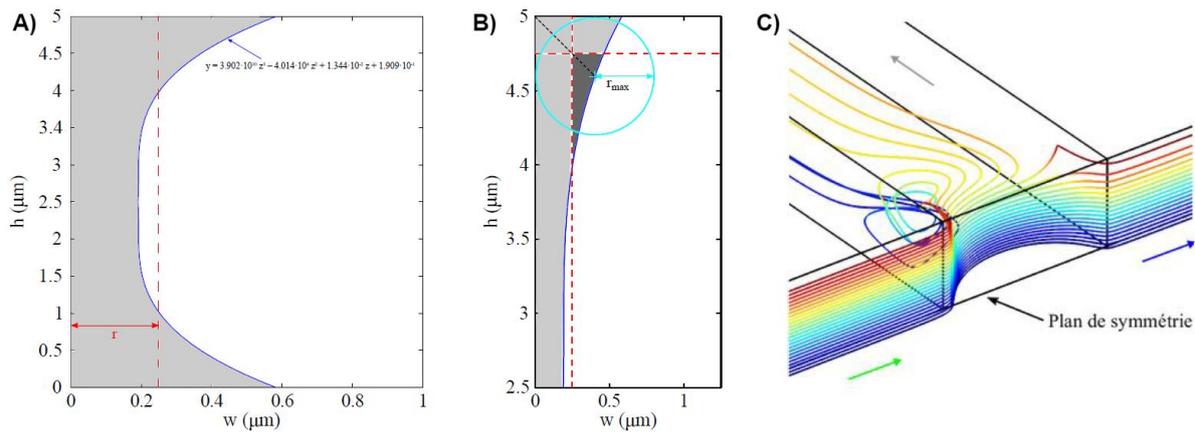


Figure III.24 - Étude numérique, réalisée par Fouet et al., du profil de la séparatrice. A) Comparaison du profil de la séparatrice admise (en pointillée rouge) et celle obtenue par simulation (en bleu). La portion de fluide aspirée dans une canalisation secondaire est représentée en gris. B) Grossissement d'une portion de la canalisation représentée en A). Taille critique calculé dans la zone en gris foncé, montrant un écart non négligeable de la portion de particules de taille supérieure au rayon de coupure et qui seront aspirées dans les canalisations secondaires. C) Simulation des profils des vitesses à la jonction entre la canalisation principale et une canalisation secondaire.

Les incertitudes liées au calcul du rapport Q^* , les phénomènes de diffusion et d'agitation thermique nous ont permis d'expliquer la présence des NP 920 dans le réservoir des sorties secondaire. Toutefois, il semblerait que leur présence soit liée, en grande partie, à l'approximation dans les calculs des profils paraboliques. En effet, il semblerait que le rayon de coupure soit supérieur à celui attendu, laissant la possibilité à quelques NP 920 d'être présent après filtration.

II. Tests de filtration d'échantillons biologiques

Une fois la validation des dispositifs faite à l'aide d'échantillons synthétiques contenant des billes calibrées, en concentration connue, nous avons étudié les performances de la filtration pour des échantillons biologiques plus complexes et hétérogènes. La TRPS étant peu adaptée à la qualification des échantillons complexes, les analyses ont été effectuées à l'aide de techniques utilisées de façon routinière en biologie, par cytométrie en flux et comptage sur cellules de Malassez.

II.1. Préparation et tests de filtration d'échantillon de plasma

II.1.a. Préparation des échantillons

Les échantillons fournis par l'EFS (Établissement Français du Sang) sont préparés à partir de poches de 250 mL de plasma sanguin humain, issu de sang total, non congelé [91]. Le plasma est essentiellement composé de sels minéraux, de lipides, de glucides et de protéines (albumine, facteur de coagulation, immunoglobulines, ...). Dans un second cas, une extraction du plasma à partir d'échantillon de sang (prélèvement fourni également par l'EFS) a été réalisée en salle de culture cellulaire, en suivant le protocole détaillé dans le tableau suivant. Environ 1 mL de plasma est récolté à partir d'un échantillon de 4 mL de sang.

Centrifugation 1	2000 x g – 10 minutes – 4 °C
Récupération du surnageant	
Centrifugation 2	2000 x g – 20 minutes – 4 °C
Récupération du surnageant	

Tableau III.15 - Protocole d'extraction du plasma sanguin à partir d'un échantillon de 4 mL de sang.

II.1.b. Tests de filtration d'échantillon de plasma

Trois types d'échantillons, contenant une gamme de NPs (NP 480-OVA ou NP 920) sont préparés et leur composition est donnée ci-dessous.

MELANGE 1	Plasma dilué 10 fois	[NP 480-OVA] = 1.10^7 particules/mL
MELANGE 2	Plasma dilué 2 fois	[NP 480-OVA] = 1.10^7 particules/mL
MELANGE 3	Plasma dilué 2 fois	[NP 920] = 1.10^7 particules/mL

Tableau III.16 - Présentation des différents mélanges préparés, contenant des NPs et du plasma sanguin.

Après filtration complète de tous les échantillons, puis application d'une étape de rinçage au PBS-Tween, les différentes solutions filtrées sont récoltées et conditionnées pour l'analyse post filtration. Contrairement à l'échantillon initial présentant une coloration orangée (Figure III.25A), nous obtenons une solution translucide (Figure III.25B). Cependant, un léger dépôt blanchâtre peut être observé, pouvant provenir des protéines présentes dans le plasma ou des facteurs d'anticoagulation utilisés pour la conservation (poche de plasma ou tube de prélèvement EDTA).

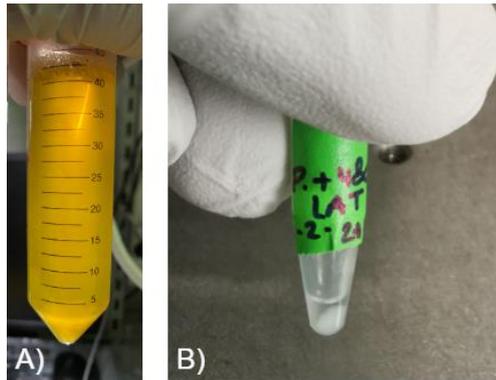


Figure III.25 - Différences d'aspect des échantillons de plasma. A) Plasma issu d'une poche fournie par l'EFS et conditionné dans un Falcon de 50 mL, avant la filtration. B) Échantillon récupéré en sortie secondaire du dispositif.

II.2. Caractérisation des échantillons de plasma

La cytométrie en flux, utilisée en biologie cellulaire et en médecine clinique (diagnostic et suivi thérapeutique par exemple), est une technologie permettant la caractérisation quantitative et qualitative (caractéristiques physiques et propriétés de fluorescences) de particules, de façon individuelle, en suspension dans un flux. Le principe repose sur l'enregistrement des passages des particules, souvent fluorescentes, devant une source de lumière, généralement un laser (Figure III.26A). La diffusion du faisceau, lors du passage des particules, donne deux informations. D'une part, la taille des particules par la diffusion frontale du faisceau (paramètres donnés par Forward Scatter noté FSC), puis sa granularité engendrée par la diffusion latérale (paramètre de Side Scatter ou SSC). Dans les deux cas, plus la particule sera grande, par sa taille et sa granularité, plus le faisceau sera dévié. Ainsi, il est possible d'obtenir des courbes de granularité en fonction du temps, où chaque événement compté correspondra à un point. Toutes les mesures et analyses ont été réalisées à l'institut Restore à Toulouse qui dispose d'une plateforme technologique adaptée. Le cytomètre (Figure III.26B) Fortessa X20 commercialisé par BD biosciences [92] a été utilisé pour la caractérisation des différents échantillons. Cet instrument comprend 5 lasers (Figure III.26C) [93] décrits dans le tableau suivant ainsi que des logiciels de pilotage et d'analyse DIVA, Flowlogic et Kaluza.

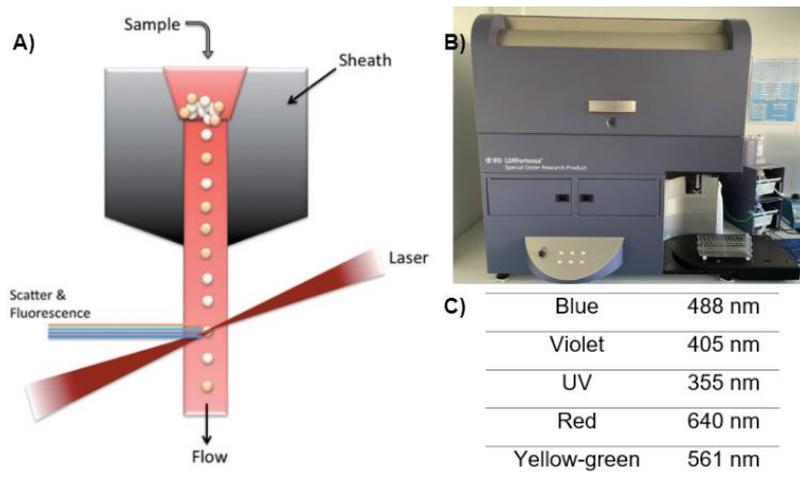


Figure III.26 - Caractérisation par cytométrie en flux. A) Principe de la cytométrie de flux. B) Cytomètre Fortessa X20 de chez BD biosciences. C) Gamme des lasers présents sur le cytomètre.

II.2.a. Analyse par cytométrie en flux et calibration des différents NPs

La cytométrie est plus particulièrement utilisée pour les espèces cellulaires, donc de taille supérieure au micromètre. Il est donc nécessaire, dans un premier temps, d'évaluer la méthode dans les cas qui nous concernent, c'est-à-dire dans le cas de particules submicrométriques. Afin d'effectuer cette évaluation, la caractérisation de solutions homogènes en taille (NP 480-OVA et NP 920) a été réalisée. Ces analyses auront pour but de calibrer nos mesures et ainsi, de définir les conditions et les paramètres de travail adéquats à nos échantillons. En connaissant le spectre d'absorption et d'émission (506 / 529 nm pour les NP 480-OVA et 636 / 686 nm pour les NP 920), deux types de courbes ont été obtenues. L'ensemble de courbes présentées sur la gauche de la Figure III.27 représentent, en abscisse, les valeurs FSC (Forward Scatter) et en ordonnée les valeurs SSC (Side Scatter). Les courbes, à droite de la Figure III.27, représentent l'intensité de fluorescence selon le nombre de particules comptées. A l'aide de ces premiers résultats de calibration, les zones de détection des deux types de billes sont identiques et pourront être rapidement retrouvées lors de l'analyse notamment de mélanges plus complexes.

Lors des analyses, plusieurs points ont attiré notre attention. Tout d'abord, la délimitation des différentes populations. La délimitation des NP 480-OVA semble être la plus délicate à obtenir. En effet, celles-ci possèdent un spectre d'absorption et d'émission à 506 / 529 nm, correspondant à la gamme du fluorochrome AmCyan compatible avec ces billes, malgré un léger décalage du spectre d'émission, a été utilisé. De ce fait, la détection de ces particules est peut-être faussée. Le fluorochrome AlexiaFluor700 a été choisi pour les NP 920 et

présente ce même problème. Aussi, pour toutes les mesures de caractérisation, notre choix a été de rester dans ces mêmes zones de détection (zone délimitée pour les NP 480-OVA en bleu et pour les NP 920 en rouge) dans le but de comparer les analyses.

De plus, sur les courbes présentées Figure III.27C, une zone de points, en noir et entourée de rouge, est présente sous la région des NP 480-OVA. Ce nuage d'évènements s'avère gênant pour la délimitation des pics des billes de 480 nm de diamètre. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la présence de ce nuage de point. En effet, ceux-ci, bien visibles sur tous les tracés, pourraient être liés soit à des bulles d'air présentes dans la solution, soit à des contaminations liées à de précédentes mesures. Malgré un nettoyage rigoureux en début de mesure, ces artefacts de mesure resteront présents dans l'ensemble des analyses réalisées en cytométrie. Ces premiers résultats confirment la difficulté attendue de travailler en cytométrie de flux dans ces gammes de taille. Dans le but de faciliter les analyses, la concentration des billes NP 480-OVA et NP 920 a été volontairement descendue à 1.10^7 particules/mL. En effet, contrairement aux analyses réalisées à l'aide du qNano, une concentration élevée n'est pas exigée.

Toutes les analyses réalisées en cytométrie de flux présenteront deux résultats. Le premier correspondra à la caractérisation de l'échantillon avant filtration, la seconde, à l'échantillon filtré.

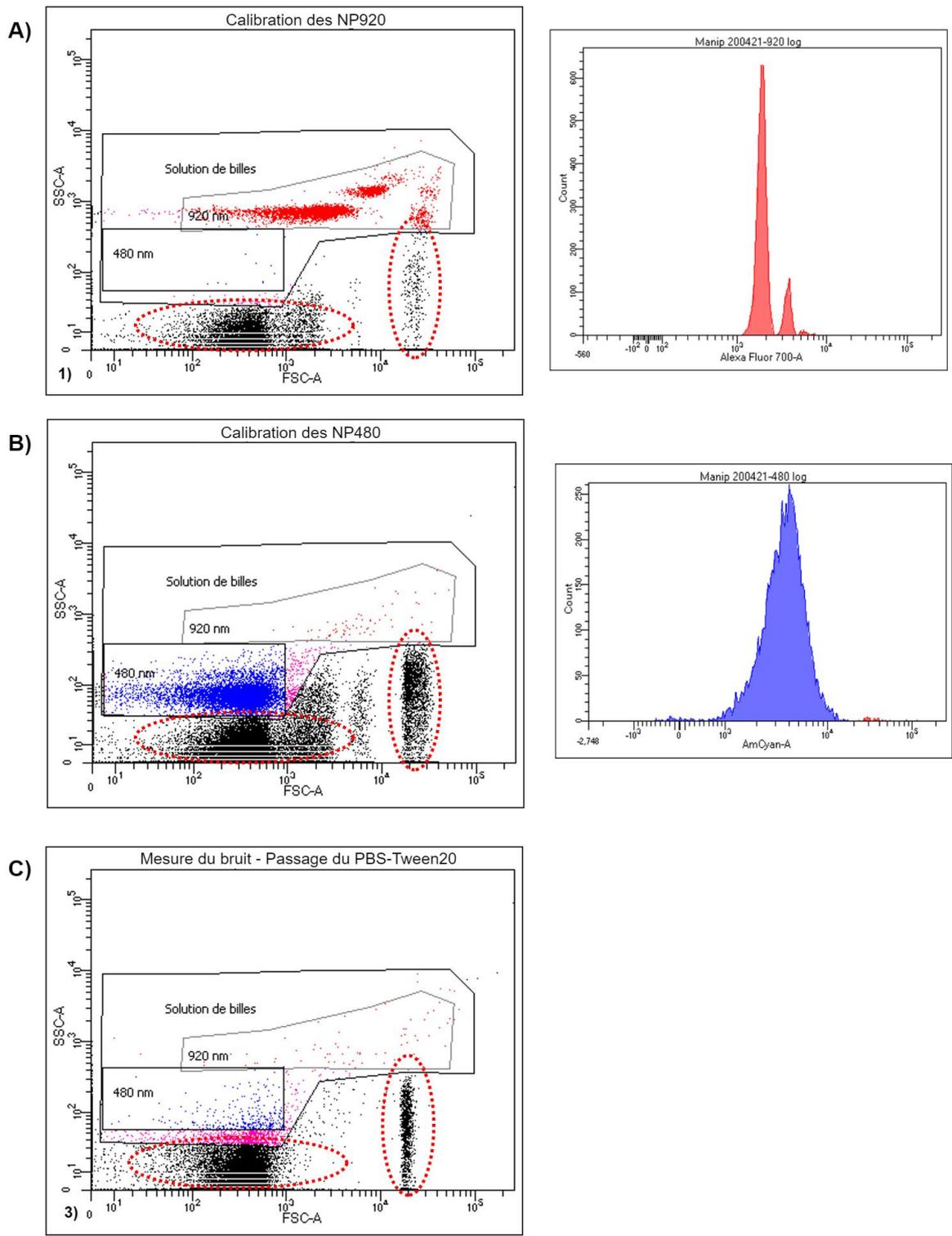


Figure III.27 - Analyse des données par cytométrie en flux des échantillons contenant un seul type de NPs. A gauche, représentation FSC par rapport à SSC. A droite, histogrammes représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de particules. A) Calibration d'un échantillon contenant des NP 920. B) Calibration d'un échantillon contenant des NP 480-OVA. C) Mesure du bruit à l'aide d'une solution de PBS-Tween20.

II.2.b. Analyse par cytométrie du mélange de NP 480-OVA avec des NP 920

La calibration des billes seules ayant été réalisée et malgré la présence d'artéfacts nuisant à la qualité des mesures, la caractérisation d'un échantillon contenant un mélange de deux types de billes (NP 480-OVA et NP 920) a été effectuée. Comme présenté en Figure III.28A, deux populations (les NP 920 en rouge et les NP 480-OVA en bleu) sont clairement visibles dans le mélange avant filtration, ce résultat étant cohérent avec la composition initiale. Après filtration, comme le montre la Figure III.28B, une diminution significative de la population rouge, c'est-à-dire des NP 920, est démontrée. Ceci va dans le sens d'un bon fonctionnement de la filtration. Cependant un étalement de la population représentée en bleu est constaté, ce qui pourrait correspondre à l'élargissement de la distribution obtenu en TRPS (Figure III.18B). Une interprétation qualitative semble cependant difficile. En effet, (1) les populations obtenues pour les échantillons initiaux ne correspondent pas à nos attentes et (2) nous observons régulièrement un étalement des populations des NPs lors des passages des échantillons filtrés malgré l'application d'un nettoyage rigoureux entre les deux mesures.

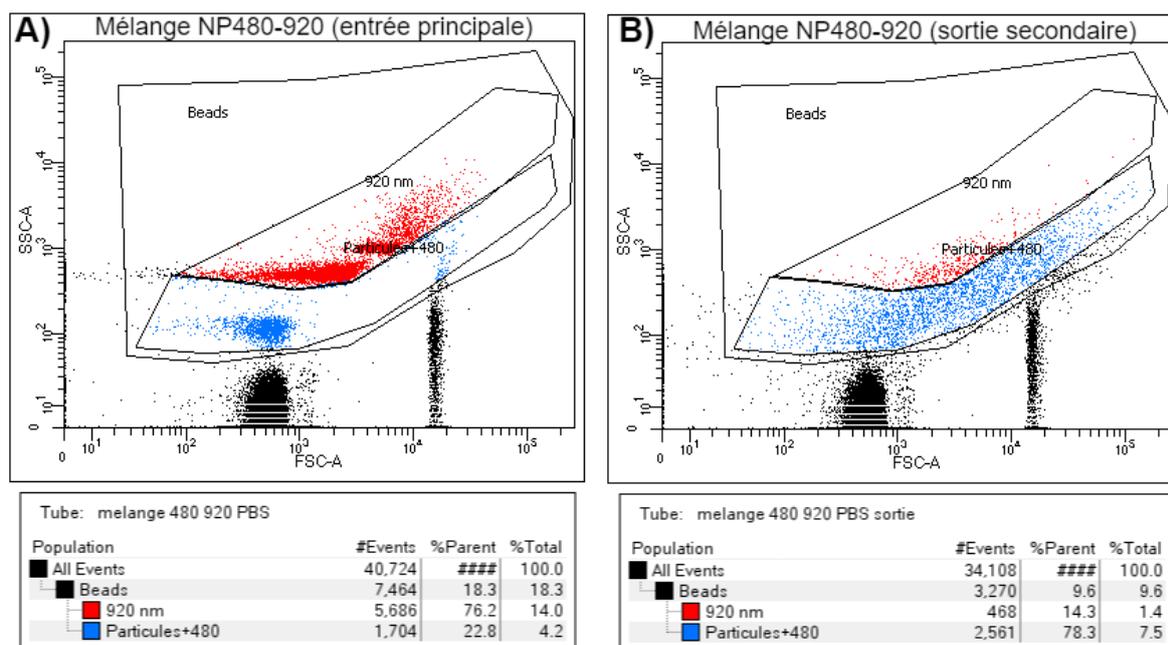


Figure III.28 - Résultat des analyses par cytométrie d'un mélange composé de NP 480-OVA et NP 920. A) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon contenant les deux tailles de billes. B) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon filtré par le dispositif de tri.

II.2.c. Analyse par cytométrie du plasma dilué 10 fois avec des NP 480-OVA

La caractérisation d'un échantillon de plasma, dilué 10 fois dans du PBS-Tween20 dans lequel des billes NP 480-OVA sont en suspension, est étudiée ici. Plusieurs points sont à souligner. Tout d'abord, seules les billes NP 480-OVA sont fluorescentes dans la solution et leurs spectres d'absorption et d'émission se situe à 506 / 529 nm (Figure III.29A). Or, la gamme des particules présentes dans le plasma, semble se situer dans cette même zone de recherche, rendant la séparation des deux populations difficilement exploitables, d'autant plus que les histogrammes représentant l'intensité de fluorescence sont de très mauvaise qualité. De plus, la présence d'éléments dans la zone correspondante à la détection des NP 920 est observée, ces éléments, pouvant, peut-être, correspondre à des particules du plasma. Ainsi, le tracé obtenu pour l'échantillon filtré (Figure III.29B) nous montre une population plus importante dans la partie correspondant aux particules de plasma et aux NP 480-OVA (population bleu). Aussi, une augmentation de la population des événements rouges est observée. Ceci tendrait à suggérer une délimitation plus large des particules présentes dans le plasma, chevauchant néanmoins la zone de détection des NP 920. Malheureusement, nous ne sommes pas arrivés à expliquer ce comportement, observé sur toutes les analyses.

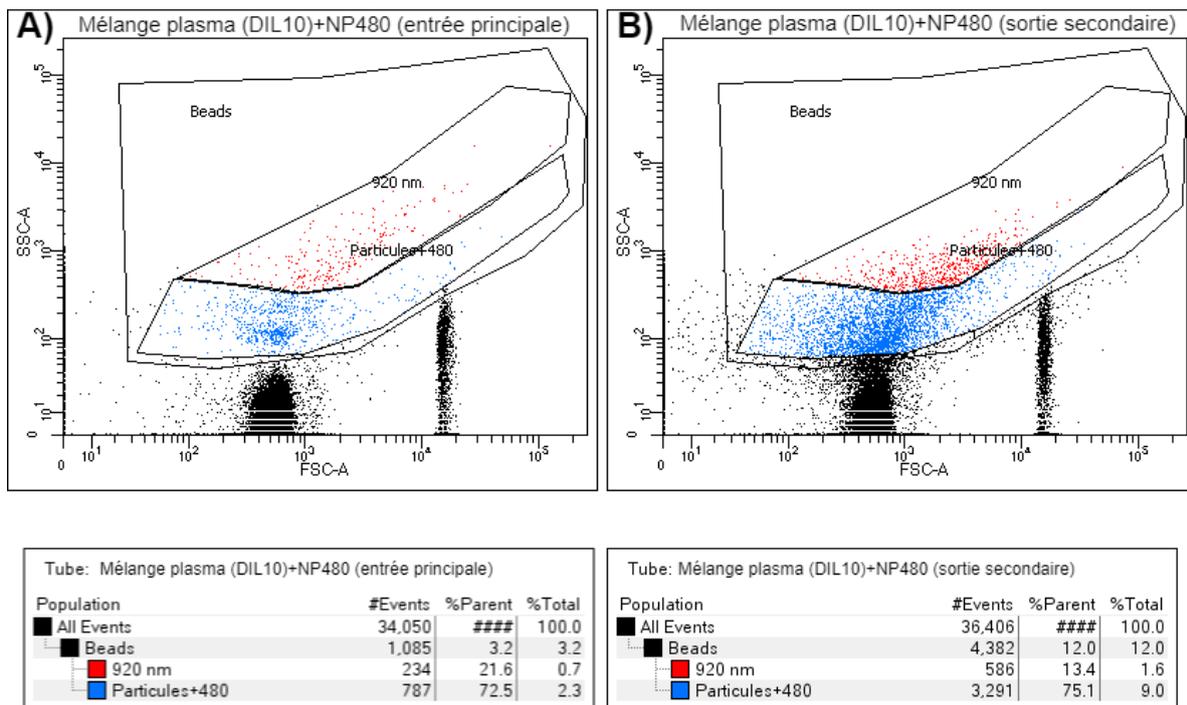


Figure III.29 - Résultats des analyses par cytométrie d'un échantillon de plasma dilué et de NP 480-OVA. A) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon avant filtration. Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon après filtration.

II.2.d. Analyse par cytométrie du plasma dilué 2 fois avec des NP 480-OVA ou NP 920

La filtration d'un échantillon de plasma, peu dilué (dilution par 2) a également été étudiée à l'aide de deux solutions contenant respectivement des billes NP 480-OVA et des NP 920.

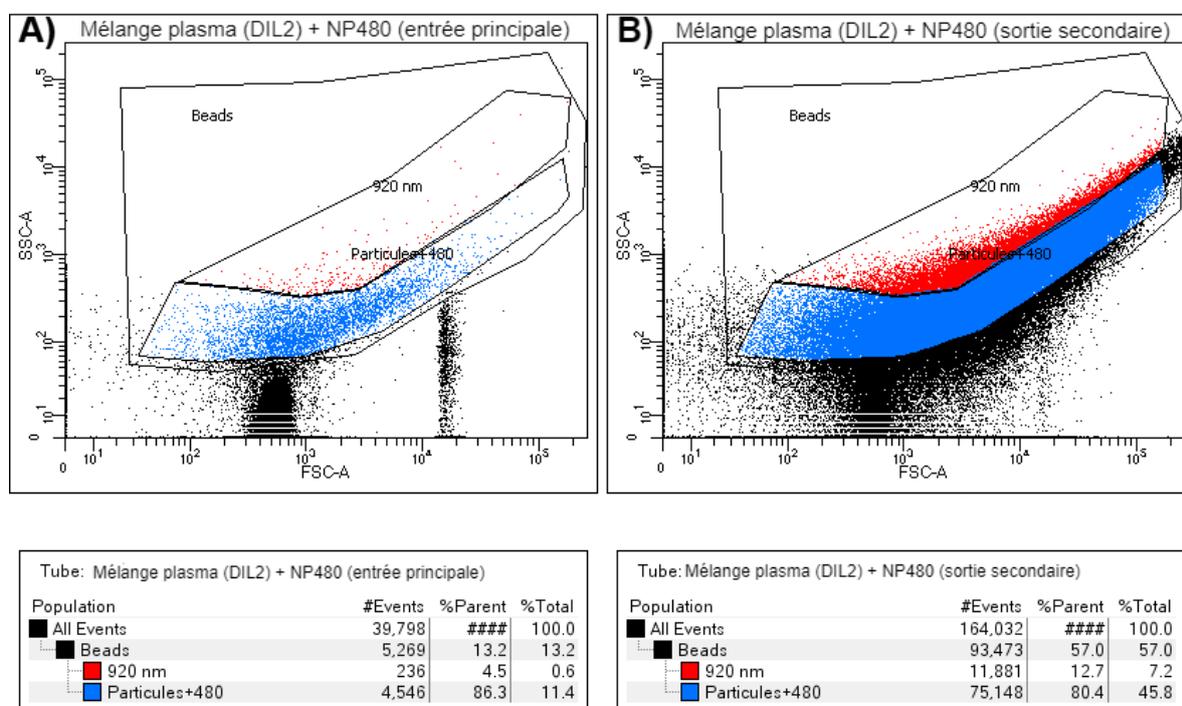


Figure III.30 - Influence des résultats de cytométrie dans un échantillon de plasma peu dilué. A) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon avant filtration, contenant du plasma et des NP 480-OVA. B) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon après filtration, contenant du plasma et des NPs 480-OVA.

Dans le cas du mélange plasma et NP 480-OVA, la caractérisation de la solution avant filtration (Figure III.30A), montre un tracé semblable à celui obtenu précédemment avec le plasma 10 fois dilué. Cependant, la population représentée en bleu, ressort en plus grande quantité, ceci s'expliquant par la dilution moins importante du plasma dans ce mélange. Toutefois, une moindre population dans la délimitation des particules couvrant la gamme des NP 920 est observée. Une fois la solution filtrée dans notre dispositif, une augmentation impressionnante de la population contenue dans la délamination des NP 480-OVA et particules du plasma (Figure III.30B) est observée. Cette augmentation est accompagnée par l'apparition de particules dans la zone des NP 920 (en rouge), mais également dans la zone non spécifique (nuage de point noir). Ce signal reste inexpliqué. Or, nous pouvons affirmer qu'il ne peut s'agir de billes de 920 nm, car aucune bille de ce type n'a été injectée dans le dispositif.

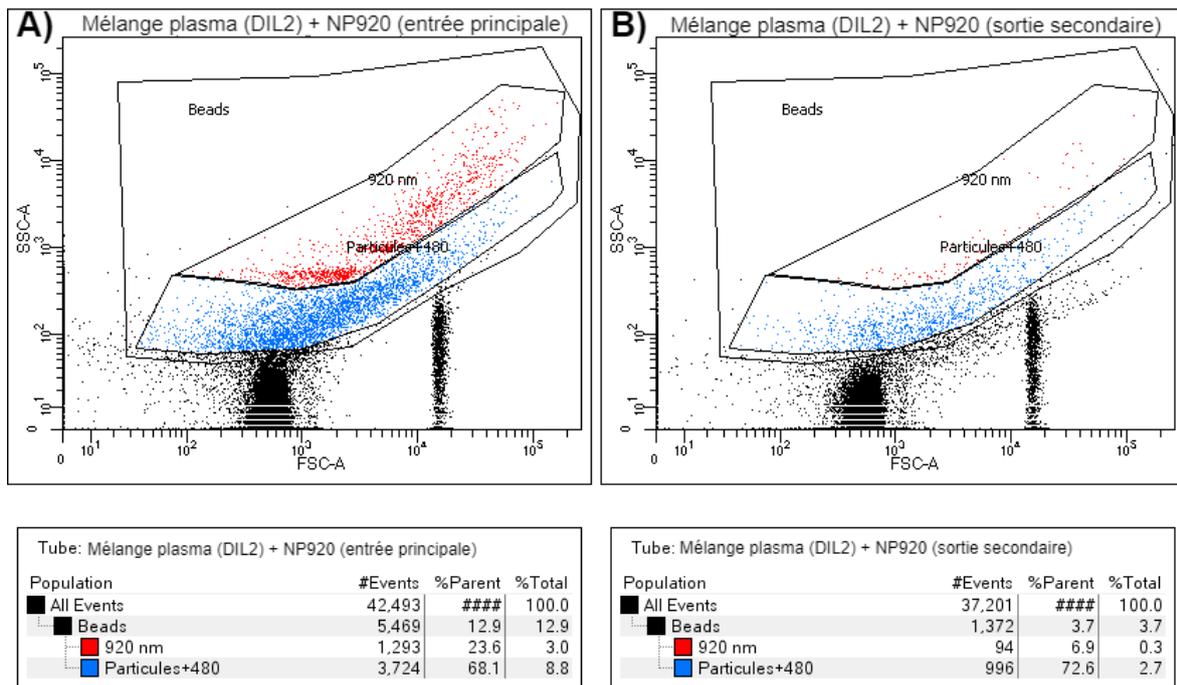


Figure III.31 - Influence des résultats de cytométrie dans un échantillon de plasma peu dilué. A) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon avant filtration, contenant du plasma et des NP 920. B) Courbe FSC par rapport à SSC de l'échantillon après filtration des NP 920.

Aussi, lors de la caractérisation du mélange contenant les NP 920, la caractérisation de l'échantillon à filtrer montre distinctement, deux populations (Figure III.31A). En effet, la population, représentée en rouge, correspond aux billes NP 920 tandis qu'en bleu, elle, regroupe l'ensemble des particules de plasma. Une fois la filtration réalisée, l'élimination, quasi-totale des NP 920 (Figure III.31B) est observée tandis que la population des particules contenues dans le plasma, semble avoir diminué, ce qui tendrait à démontrer une filtration de cet échantillon.

II.2.e. Conclusion

La caractérisation des échantillons par cytométrie en flux possède plusieurs avantages comparés à l'analyse TRPS. D'un point de vue du temps d'expérience, les mesures sont plus rapides (débit moyen des échantillons de 35 $\mu\text{L}/\text{min}$) et peuvent également être répétées plusieurs fois sans provoquer de colmatage de l'instrument de mesure. Concernant les gammes de détection, il est possible de travailler avec des échantillons ayant des concentrations inférieures à 1.10^7 particules/mL contre plus de 1.10^8 particules/mL pour le qNano, ceci permettant la dilution des échantillons et ainsi l'analyse d'un plus grand volume. Cependant, cette technique, présente des inconvénients notamment dans le cas d'échantillons ne possédant pas de fluorescence correspondant à la gamme des lasers du

cytomètre. De plus, l'analyse des NP 140-CAS n'a pas été possible par cytométrie de flux, leur petite taille, étant dans la limite basse de détection. Dans le cas d'un échantillon issu de sang complet, c'est-à-dire présentant une grande hétérogénéité en taille, l'analyse par cytométrie n'est pas possible.

L'ensemble de ces caractéristiques réalisées en cytométrie en flux a montré la difficulté à travailler dans cette gamme de taille. Une exploitation quantitative a été complètement impossible. Toutefois, ces expériences semblent vérifier qualitativement la forte diminution des NP 920 après toutes les filtrations étudiées. D'autre part, comme observé lors des caractérisations faites en TRPS, un étalement du nombre d'évènement des NP 480-OVA après la filtration est présent. Cette augmentation, pourrait-être lié à l'agrégation des billes lors de l'analyse. De ce fait, la diffusion du faisceau du laser pourrait être faussée à cause de la formation de regroupement de billes de 480 nm de diamètre. En effet, avant l'analyse cytométrique, les échantillons n'ont pu être passés dans un bain à ultrason et n'ont subi que quelques secondes de vortex. Cependant, nous pouvons remarquer, qu'en présence de plasma, les dispositifs de tri fonctionnent correctement, même si, lors de l'analyse Figure III.31B, une diminution de la population des particules de plasma semble avoir été observée.

Au bilan de ces analyses de caractérisation, l'utilisation de la cytométrie semble toutefois peu adaptée à la problématique ou nécessiterait des études plus approfondies pour obtenir des résultats quantitatifs et reproductibles.

II.3. Préparation et test de filtration d'échantillon de sang

Une fois l'analyse d'échantillons du plasma réalisée, nous avons également voulu étudier l'influence d'un milieu biologique encore plus complexe : le sang complet. Comme pour les expériences avec du plasma, différentes concentrations de sang sont testées. Pour cela, nous avons réalisé une première filtration en diluant par 100 un échantillon de sang frais. Nous avons préparé deux échantillons à filtrer : un contenant des NP 480-OVA et l'autre des NP 920. Toutefois, nous avons souhaité réduire la concentration des billes pour deux raisons. En effet, le sang, contient de nombreuses cellules très hétérogènes en taille, les plus grosses pouvant mesurer jusqu'à 20 μm , il nous semblait judicieux de réduire le risque de colmatage en entrée principale des dispositifs de tri. Les mesures par cytométrie s'étant montrées décevantes, nous avons réfléchi à un moyen d'analyse quantitative compatible avec une gamme de taille aussi hétérogène que celle présente dans le sang complet. Cette technique sera expliquée dans la partie suivante.

II.3.a. Filtration d'un mélange de sang complet et de billes

Un premier intérêt s'est porté sur les dilutions des milieux biologiques [94] [95]. Nous avons donc préparé des solutions contenant du sang dilué seulement 10 fois dans du PBS-Tween20. Dans un premier temps, deux échantillons contenant des NP 480-OVA et NP 920 respectivement dans du sang dilué puis une troisième solution, très complexe, composée de sang complet et de NP 480-OVA et NP 920 en concentration identique.

Les différentes concentrations et dilution de nos préparations sont données dans le tableau suivant.

MELANGE 1	Sang dilué 100 fois	[NP 480-OVA] = 2.10^6 particules/mL
MELANGE 2	Sang dilué 100 fois	[NP 920] = 2.10^6 particules/mL
MELANGE 3	Sang dilué 10 fois	[NP 920] = 2.10^6 particules/mL
MELANGE 4	Sang dilué 10 fois	[NP 480-OVA] = 2.10^6 particules/mL [NP 920] = 2.10^6 particules/mL

Tableau III.17 - Récapitulatifs des différents mélanges préparés, contenant des NPs et du sang complet.

Comme lors des expériences de filtration du plasma, nous avons injecté, dans les dispositifs de tri et durant une trentaine de minutes, les différentes préparations à une pression de 1 bar. Nous avons effectué une étape de rinçage à l'aide d'une solution de PBS-Tween20 afin de récolter l'ensemble de l'échantillon filtré présent dans le réseau de canalisations. Pour chaque expérience, nous gardons une petite quantité des différents échantillons injectés puis nous récoltons, en sortie secondaire, les solutions filtrées. Nous voyons visuellement une différence entre les échantillons initiaux et ceux ayant été filtrés dans les puces microfluidiques (Figure III.32). En effet, tous les échantillons de sang présentent une coloration rouge, cette coloration étant due à la présence, en grande quantité, de globules rouges. Or, après filtration, les échantillons filtrés deviennent transparents. Nous pouvons en déduire que les échantillons, récupérés en sortie secondaire et ayant été filtrés, sont dépourvus de globules rouges, démontrant ainsi, une filtration de ces cellules de taille supérieure au rayon de coupure.

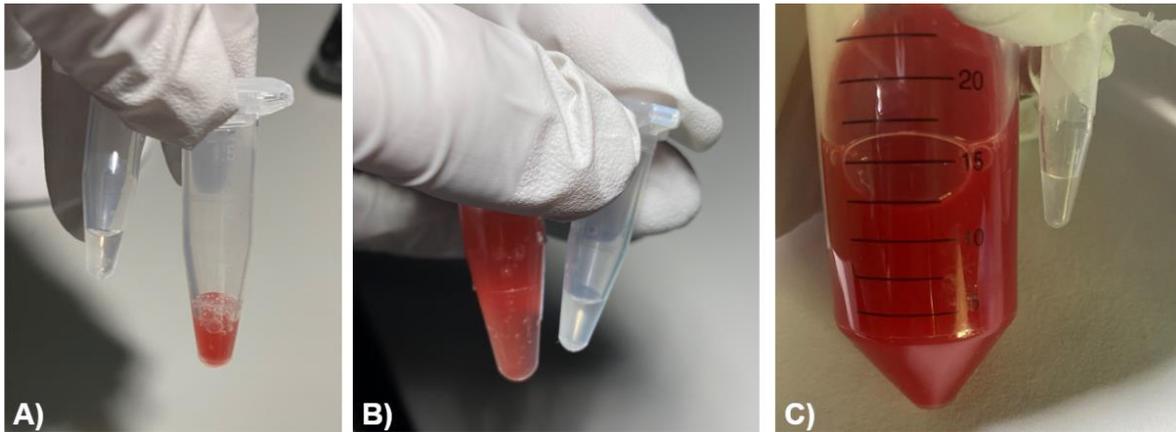


Figure III.32 - Comparaison d'échantillons injectés et filtrés dans les dispositifs de tri. A) A gauche échantillon récupéré après filtration et à droite l'échantillon initial contenant du sang dilué 100 fois et des billes NP 480-OVA. B) Échantillon à filtrer contenant du sang dilué 100 fois et des NP 920 à gauche et l'échantillon filtré à droite. C) Sang dilué 10 fois et mélangé avec des NP 480-OVA et NP 920 avant filtration et récupération de l'échantillon filtré à droite.

II.3.b. Caractérisation des tests de filtration par comptage de cellules

La caractérisation des échantillons contenant du sang, plus ou moins dilué, étant impossible en TRPS et en cytométrie, l'utilisation d'une autre technique a été envisagée. Pour se faire, notre choix s'est porté sur la cellule de numération Fast Read102 [96], une lame en plastique, qui permet un usage rapide et unique, de la lecture simultanée de cellules. Ainsi, la configuration particulière des cellules de numération ; chaque grille contient 10 carrés (ayant un volume de 0.1 μ L par carré), eux même divisés en 16 secteurs ; permet d'obtenir les concentrations cellulaires, en appliquant la formule décrite en suivant. Ces analyses sont réalisables à partir d'une dizaine de μ L de solution transférée, par capillarité, dans les chambres.

$$\text{Nombre de cellules/mL} = \frac{\text{Nombre de cellules comptées}}{\text{Nombre de carrés comptés}} \times \text{Facteur de dilution} \times 10^4 \quad (\text{III.1})$$

II.3.c. Analyse de la filtration d'un échantillon de sang dilué 100 fois

Des observations en grossissement 10x ont été réalisées à l'aide d'un microscope de fluorescence droit. En observant en lumière blanche, nous avons pu constater la présence de nombreuses cellules (Figure III.33A) issues de l'échantillon injecté en entrée principale de notre dispositif. Après filtration, la solution est totalement déplétée de cellules (peut-être un globule rouge observé Figure III.33B).

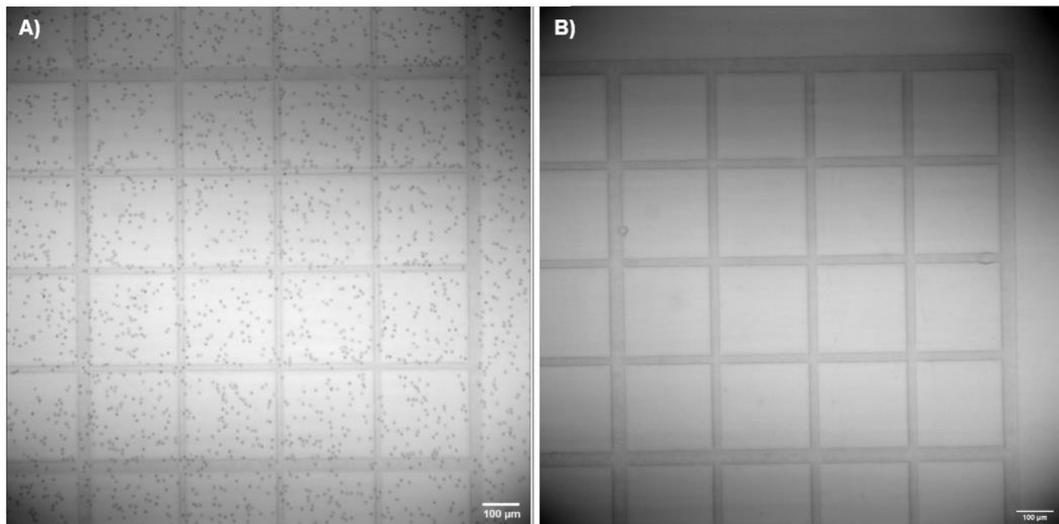


Figure III.33 - Observation au microscope droit d'un mélange sang dilué 100 fois et NP 480-OVA en lumière blanche. A) Échantillon de sang avant filtration, observé dans une cellule de Malassez. B) Échantillon après filtration des cellules du sang.

Afin de compter les billes NP 480-OVA, le passage en lumière fluorescente a été obligatoire. Leur nombre a été compté avant (Figure III.34A) et après filtration (Figure III.34B), ce qui a permis de calculer leur concentration. Dans la solution initiale, la concentration observée est de $1.96 \cdot 10^6$ particules/mL contre $2.09 \cdot 10^6$ particules/mL supposées après filtration. Les billes étant comptées « manuellement », des erreurs peuvent toutefois entrer en compte dans les valeurs des concentrations finales. Cependant, il est toutefois acceptable de dire, que ces deux concentrations sont comparables.

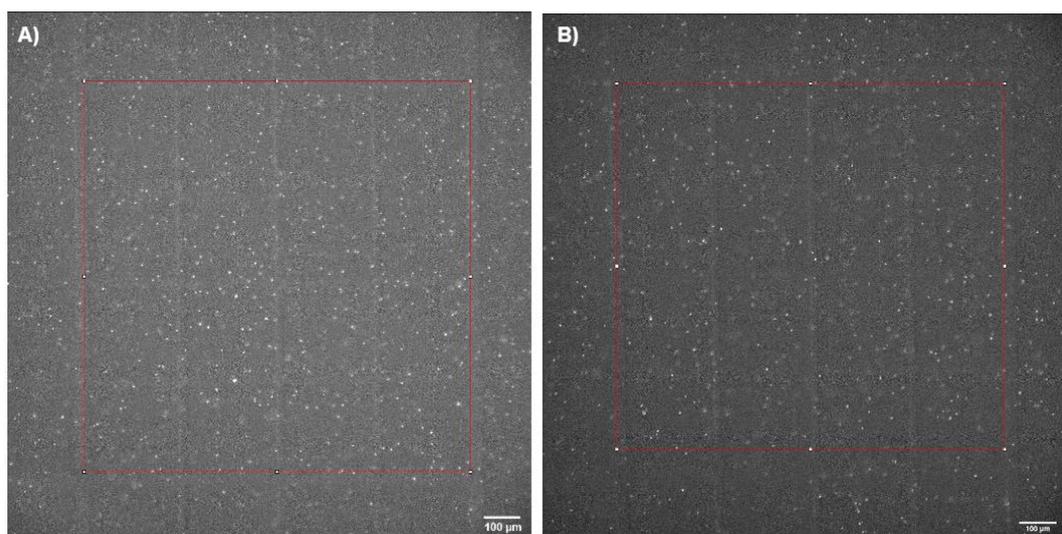


Figure III.34 - Observation au microscope droit d'un mélange sang dilué 100 fois et NP 480-OVA en lumière fluorescente. A) Échantillon des NP 480-OVA avant filtration. B) Après filtration des NP 480-OVA.

FILTRATION DE NP 480-OVA SUR CELLULE DE MALASSEZ		
	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1.96.10 ⁶ particules/mL ± 4 %	2.09.10 ⁶ particules/mL ± 3 %

Tableau III.18 - Comparaison de la concentration initiale et calculée à l'aide de la cellule de Malassez après filtration des NP 480-OVA, en présence de sang dilué 100 fois.

NP 480-OVA DANS DU SANG DILUE 100 FOIS	
Taux de filtration T_F	- 6 %
Taux de récupération T_R	106 %

Tableau III.19 - Taux de filtration et de récupération, après filtration des NP 480-OVA, en présence de sang dilué 100 fois.

Cette même méthode est appliquée à l'échantillon de sang et de NP 920 (Figure III.35A) et nous observons, l'élimination des cellules (Figure III.35B) après filtration. En passant en lumière fluorescente, le nombre de NP 920 présentes dans l'échantillon initial est de 180 particules contre seulement 6 NP 920 comptés après filtration. Le nombre de particules comptées après la filtration étant très faible, la concentration qui en découle est biaisée.

FILTRATION DE NP 920 SUR CELLULE DE MALASSEZ		
	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	1.810 ⁶ particules/mL ± 10 %	6.10 ⁴ particules/mL

Tableau III.20 - Comparaison de la concentration initiale et calculée à l'aide de la cellule de Malassez après filtration des NP 920, en présence de sang dilué 100 fois.

NP 920 DANS DU SANG DILUE 100 FOIS	
Taux de filtration T_F	97 %
Taux de récupération T_R	3 %

Tableau III.21 - Taux de filtration et de récupération, après filtration des NP 920, en présence de sang dilué 100 fois.

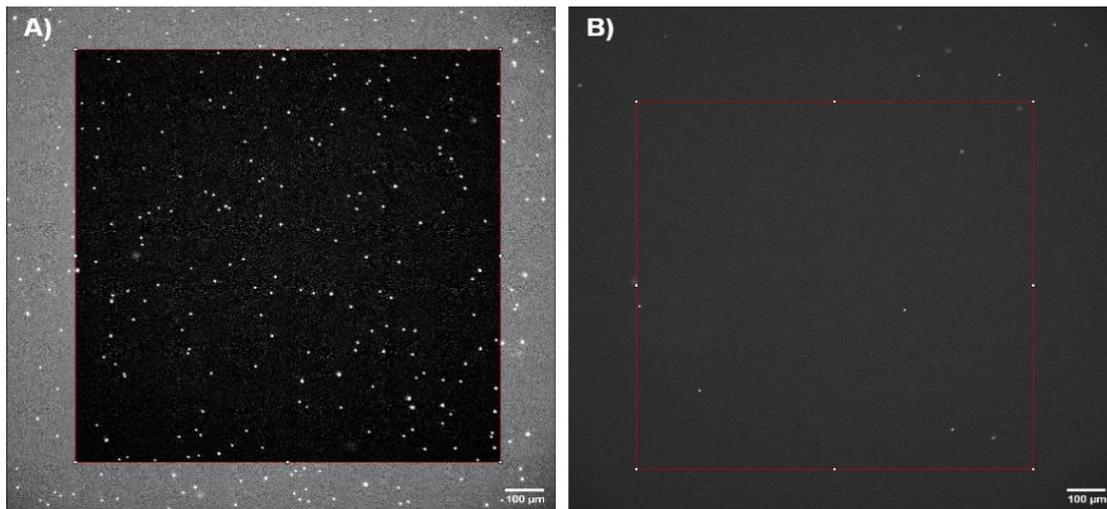


Figure III.35 - Observation au microscope droit d'un mélange sang dilué 100 fois et NP 920 en lumière fluorescente. A) Échantillon des NP 920 avant filtration. B) Après filtration des NP 920.

II.3.d. Analyse de la filtration d'un échantillon de sang dilué 10 fois

Afin de déterminer si la filtration est impactée par l'encombrement cellulaire, des expériences similaires ont été réalisées avec du sang complet dilué 10 fois. En premier lieu, un échantillon contenant exclusivement des NP 920 a été testé.

215 billes (Figure III.36A) ont été comptées avant la filtration ce qui correspond à une concentration de $2.15 \cdot 10^6$ particules/mL. Sur la Figure III.36B, quelques billes NP 920 ont été trouvées après passage dans le dispositif de tri, démontrant une bonne filtration par notre système. Cependant, l'observation d'agrégat de cellules est visible provenant potentiellement de l'échantillon biologique car non fluorescent.

FILTRATION DE NP 920 SUR CELLULE DE MALASSEZ		
	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION	$2.15 \cdot 10^6$ particules/mL \pm 8 %	$5 \cdot 10^4$ particules/mL

Tableau III.22 - Comparaison de la concentration initiale et calculée à l'aide de la cellule de Malassez après filtration des NP 920, en présence de sang dilué 10 fois.

NP 920 DANS DU SANG DILUE 10 FOIS	
Taux de filtration T_F	98 %
Taux de récupération T_R	2 %

Tableau III.23 - Taux de filtration et de récupération, après filtration des NP 920, en présence de sang dilué 10 fois.

Ces résultats, semblables de ceux obtenus précédemment, montrent que le système de filtration n'est pas perturbé par la dilution moins importante du sang.

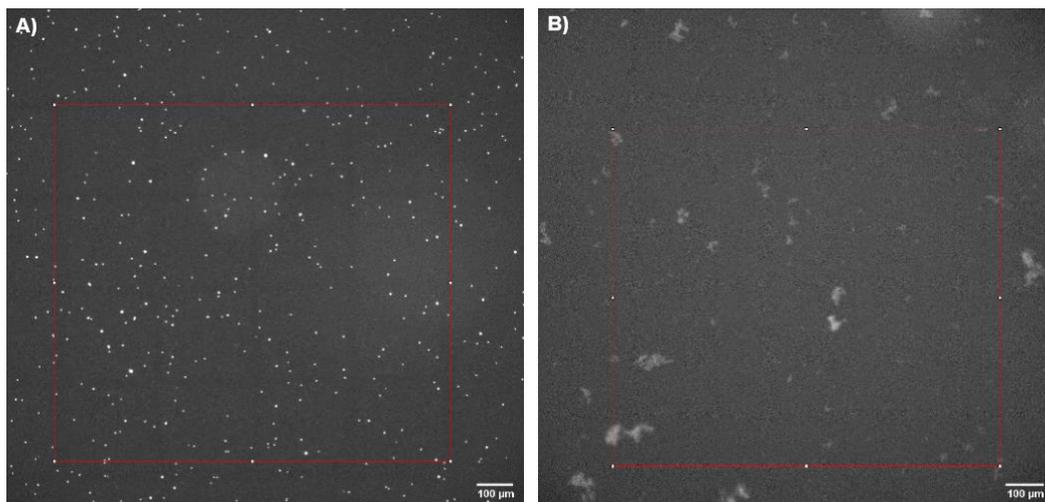


Figure III.36 - Observation au microscope d'un mélange sang peu dilué et NP 920 en lumière fluorescente. A) Échantillon des NP 920 avant filtration. B) Après filtration des NP 920.

La caractérisation d'un mélange complexe, contenant du sang dilué 10 fois, et des NP 480-OVA et NP 920 en concentration identique est réalisée. Nous pouvons constater trois points. Tout d'abord, la filtration des cellules du sang s'est déroulée de façon attendue comme le montre les figures suivantes. En effet, avant filtration, les carrés de comptage sont totalement saturés, rendant leur visualisation difficile. Toutefois, l'observation de l'échantillon après filtration ne montre plus la présence de cellules hématopoïétiques. Toutefois, nous observons, après filtration du sang frais, la présence de longs filaments.

FILTRATION DE NP480-OVA ET NP 920 SUR CELLULE DE MALASSEZ		
	ÉCHANTILLON INITIAL	ÉCHANTILLON APRES FILTRATION
CONCENTRATION NP 480-OVA	1.93.10 ⁶ particules/mL ± 4 %	1.87.10 ⁶ particules/mL ± 7 %
CONCENTRATION NP 920	1.72.10 ⁶ particules/mL ± 14 %	Peu de particules comptées

Tableau III.24 - Comparaison de la concentration initiale et calculée à l'aide de la cellule de Malassez après filtration des NP 480-OVA et des NP 920, en présence de sang dilué 10 fois.

Concernant les billes NP 480-OVA, non filtrées par les dispositifs, leur nombre est conservé après filtration. En effet, 193 particules ont été comptées contre 187 après filtration. Enfin, le nombre des NP 920 issues de la solution injectée et de la solution filtrée a été compté : 172 particules ont été trouvées dans l'échantillon initial tandis que seulement 5 ont été trouvées après filtration. Cette information nous indique donc le bon fonctionnement du dispositif de tri.

FILTRATION D'UN MELANGE DANS DU SANG DILUE 10 FOIS	NP 480-OVA	NP 920
Taux de filtration T_F	3 %	97 %
Taux de récupération T_R	97 %	3 %

Tableau III.25 - Taux de filtration et de récupération, après filtration d'un mélange de NP 480-OVA et NP 920, en présence de sang dilué 10 fois.

II.3.e. Conclusion

L'ensemble des caractérisations réalisées à l'aide de la cellule à numération Fast Read 102 a permis de mettre en évidence deux choses. En premier, nous observons une diminution significative du nombre de NP 920 après filtration. En second, l'ajout d'un milieu biologique, comme le sang, n'engendre pas de perturbation significative du mécanisme de filtration. En effet, les différentes dilutions testées ne montrent pas de changement dans l'efficacité de filtration : pour les trois expériences réalisées, le taux de filtration des NP 920 est inchangé quel que soit le facteur de dilution du sang.

III. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons détaillé l'ensemble des études réalisées sur les dispositifs de tri à 1, 10 et 100 canalisations secondaires. Les différents protocoles et tests microfluidiques ont été donnés et expliqués. Nous avons effectué, dans un premier temps et à l'aide de solutions dites synthétiques, la preuve de concept des laboratoires sur puce. Ces premières expériences nous ont permis l'injection de mélange de billes de tailles définies puis de passer

à des échantillons plus complexes, contenant des particules biologiques (plasma et sang complet). Une fois la filtration terminée, une étape de quantification a été mise en place. Pour cela, différentes techniques (Tunable Repulsive Sensing Pulse, cytométrie en flux et comptage par cellule de Malassez) ont été utilisées, selon la nature de la solution à étudier.

Dans un premier temps, des solutions de billes homogènes (NP 480-OVA, NP 920 et NP 140-CAS) ont été préparées et analysées à l'aide du qNano. Les expériences de filtration, répétées plusieurs fois, ont permis de comparer les concentrations de la solution initiale, c'est-à-dire la solution injectée dans la puce, aux concentrations obtenues après filtration. Pour s'assurer du bon fonctionnement des dispositifs, les taux de récupération et de filtration ont été calculés. Deux points sont à soulever :

- Obtention d'un taux de récupération élevé pour les NP 480-OVA et NP 140-CAS. En effet, dans le cas des analyses TRPS de ces deux tailles de billes, ce taux est de l'ordre de 100 %. Ceci signifie que la concentration de billes injectée est identique à celle obtenue après filtration. Ce résultat est cohérent avec nos attentes. En effet, ces deux billes sont inférieures au rayon de coupure et ne sont donc pas filtrées par les dispositifs, c'est-à-dire que nous pouvons les récolter en sortie secondaire des dispositifs fluidiques.
- Obtention d'un taux de filtration élevé pour les NP 920. En effet, nous avons calculé un taux de l'ordre de 98 %, nous montrant ainsi, la bonne séparation des billes NP 920, de taille supérieure au rayon de coupure. Cependant, ce taux nous montre une filtration non totale de l'échantillon injecté.

Le taux de filtration non total des NP 920, nous a amené à formuler plusieurs hypothèses concernant leur présence dans le réservoir de la canalisation secondaire. Tout d'abord, nous avons réévalué la valeur du rapport Q^* . Nous avons mis en évidence un écart significatif entre celui calculé à partir de l'approximation d'un profil parabolique ou à partir des vitesses exactes. Dans le cas du dispositif de tri que nous avons conçu, le rayon de coupure serait donc proche de 450 nm . La dernière hypothèse est liée au profil de la séparatrice dans les coins des canalisations. Nous n'avons pas fait de calculs précis sur ce point. Toutes ces perturbations peuvent ainsi engendrer des décalages sur le rayon critique choisi.

L'étude par TRPS s'est révélée être une technique d'utilisation délicate et la reproductibilité entre expérience n'est pas idéale. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Une préparation des solutions à étudier non homogènes (mauvais pipetage lors du dépôt de l'échantillon sur le nanopore)

- Une mauvaise reproductibilité du perçage manuelle et nanométrique des nanopores utilisés lors des mesures TRPS

La quantification d'un mélange contenant deux tailles de billes très éloignées (NP 140-CAS et NP 920), n'a pu aboutir la technique étant mal adaptée à l'étude de ces populations aux tailles si distinctes. Dans le cas d'un mélange de deux billes de taille plus proche (NP 480-OVA et NP 920), des décalages des distributions en taille et concentration ont été observés dans l'étude de la solution initiale. L'analyse, plus complexe, nous a cependant permis de déterminer le taux de filtration et de récupération des différentes billes, et nous montre, une fois encore, une bonne filtration des NP 920 (taux de filtration de 96 %).

Afin de caractériser des échantillons biologiques, plasma et sang complet, nous avons testé deux méthodes de comptage : la cytométrie en flux et le comptage sur cellule de Malassez.

Les études en cytométrie en flux, réalisées sur des solutions modèles de NP 140-CAS n'ont pas été possibles et celles avec des NP 480-OVA se sont avérées très délicates, car proche de la limite de détection de l'instrument. De plus, l'analyse de sang complet n'est pas possible par cette technique. Aussi, la présence de deux artefacts de mesure ne nous a pas permis de quantifier correctement les populations des NP 480-OVA et NP 920. Toutefois, l'analyse des NP 480-OVA et NP 920, ainsi que l'échantillon après filtration, semble mettre en évidence la bonne filtration des NP 920 dans les dispositifs de tri, malgré que les données obtenues numériquement par cytométrie ne soient pas exploitables quantitativement.

Les deux premières méthodes ne nous ayant pas permis d'analyser des échantillons de sang complet, nous avons choisi d'utiliser une cellule de Malassez. Cette cellule de comptage nous a permis de réaliser les quantifications des échantillons de sang contenant des NP 480-OVA ou NP 920. Nous avons mis en évidence les points suivants :

- Un taux de filtration des NP 920 de l'ordre de 97 %
- Un taux de récupération des NP 480-OVA supérieur à 97 %

De plus, ces expériences ont montré que la qualité de filtration n'était pas affectée par la complexité du milieu. En effet, dans le cas de forte (dilution par 100) et de faible dilution (dilution par 10) du sang, les résultats obtenus à l'aide des cellules de Malassez, sont similaires. Ceci tendrait à dire que la filtration n'est pas impactée par l'encombrement lié à la complexité du milieu. Ceci nous confirme donc une réelle utilisation de sang complet possible dans les dispositifs de tri.

Dans le but d'améliorer l'étape de filtration d'échantillon, plusieurs points doivent être améliorés. Tout d'abord, la création de nouvelles puces doit être réalisée en reconsidérant la

valeur du rapport Q^* correspondant aux valeurs des vitesses exactes. Ceci nous permettra de réaliser des séparations de particules au bon rayon de coupure (c'est-à-dire à $R_c = 350$ nm). Lors de la création de ces nouveaux modèles, des améliorations dans la structure des canalisations doivent être prises en compte. Afin de minimiser les effets de perturbation d'écoulement, la jonction entre la canalisation principale et les jonctions intermédiaires sera modifiée. Pour cela, nous imaginons une jonction, possédant un angle de 30° , différente de celle conçue sur les anciens motifs, permettant un écoulement sans perturbation et limitant les effets non désirés. Aussi, la forme des ouvertures fluidiques devra être également modifiée. Ce changement aura pour but de ne pas créer de perturbation ou de zone de bouchage (Figure III.37), régulièrement observée dans le cas d'ouvertures sphériques.

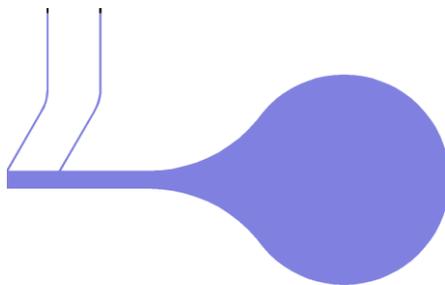


Figure III.37 - Proposition d'amélioration pour les futures structures des dispositifs de tri. Les canalisations intermédiaires seront inclinées à un angle de 30° pour limiter les effets de diffusion thermique et les ouvertures fluidiques posséderont une forme de « poire ».

De plus, il sera possible d'imaginer la création de dispositifs possédant une structure totalement différente de celle actuelle : 50 canalisations secondaires de chaque côté d'une canalisation principale. L'intérêt majeur de ces futures puces sera l'augmentation du débit dans la canalisation principale due au raccourcissement de la longueur de celle-ci. Ainsi, la filtration d'un volume équivalent sera réalisée plus rapidement dans ces nouveaux dispositifs, ceci permettant un meilleur rendement du système.

**CHAPITRE IV : LABORATOIRE SUR PUCE DE
TRI ET DE CAPTURE DES VESICULES
EXTRACELLULAIRES**

Ce dernier chapitre est consacré à la connexion des deux modules (dispositif de tri et module de capture NBA) développés durant le projet MADNESS. Pour cela, l'expertise de deux laboratoires, le LAAS-CNRS pour la partie microfluidique et l'institut FEMTO-ST concernant la partie bioanalytique a été mise à profit. Les deux chapitres précédents étant consacrés au principe de fonctionnement, aux expériences microfluidiques et aux différentes analyses réalisées à l'aide du dispositif de tri, aucune nouvelle information portant sur ce module ne sera redonnée ici. Toutefois, pour introduire la plateforme bio analytique, une première partie, sera consacrée à une description rapide de celle-ci, conçue par le partenaire de Besançon.

Dans une seconde partie, nous présenterons les expériences réalisées (1) préalablement à FEMTO-ST sur le module NBA puis (2) lors de couplage du module de tri et de capture, c'est-à-dire sur le laboratoire sur puce MADNESS (LOC MADNESS). Pour cela, des expérimentations, en premier lieu réalisées en milieu synthétique (nanoparticules NPs en PBS-Tween20), puis en présence d'échantillons biologiques (NPs en PPL ou plasma sanguin) présentant des EVs et possédant une complexité croissante, seront présentées. Des comparaisons seront faites entre les résultats obtenus avant et après la connexion des modules de tri et de capture afin de déterminer l'influence de cette mise en commun.

Enfin, une dernière partie portera sur les potentielles améliorations à amener au laboratoire sur puce MADNESS ainsi qu'à une conclusion générale sur ces nombreuses expériences.

I. Laboratoire sur puce MADNESS : association des modules de tri et de capture pour la séparation et la qualification des EVs

Le projet ANR MADNESS met en avant le développement d'une solution couplant deux modules, permettant l'isolement des EVs à partir d'un échantillon complexe, dans notre cas un échantillon sanguin et la capture immunologique des particules submicrométriques sur une puce. Pour cela, un module de tri, développé au LAAS-CNRS, et un module de capture (module NBA), développé à FEMTO-ST, ont été développés parallèlement.

I.1. Description du module NBA

Le module NBA est une plateforme de biodétection, sans marquage, multiplexe et en temps réel pour l'analyse des phénotypes des tailles et de la morphologie des sous populations d'EVs. Elle est conçue de manière à être couplée avec les techniques d'analyse par SPRi (mesure les changements d'indice de réfraction locaux [99]), AFM et de spectroscopie de masse.

Le module se compose d'une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine couche d'or [100]. Celle-ci est fonctionnalisée par une couche moléculaire auto-assemblée SAM, terminée

par une fonction carboxylique, permettant de fixer des anticorps ou ligands [101]. La biofonctionnalisation de la surface de la puce d'or est réalisée à l'aide d'une technique manuelle de spotting [102] (Figure IV.1), créant ainsi des zones présentant des ligands différents, permettant l'analyse de sous-populations de nanoparticules biologiques. Cette puce est insérée dans une cellule microfluidique. La puce microfluidique a été conçue de manière à ce que les propriétés des écoulements soient comparables à celles dans une chambre SPRi. Six spots de 1.5 mm de diamètre chacun, sont réalisés sur la puce et le volume de la cellule microfluidique est de 2.4 mm³. Un joint en PDMS permet de délimiter cette surface et rend étanche la cellule (Figure IV.2). Cette fermeture est réversible pour permettre l'analyse par SPRi et AFM par la suite.

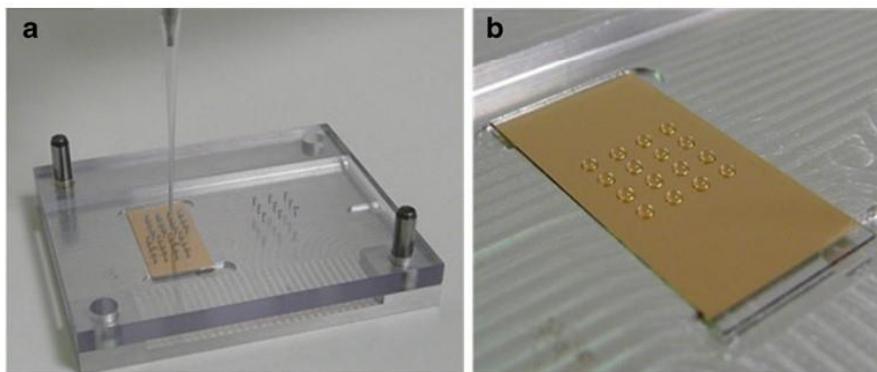


Figure IV.1 - Méthode de spotting manuellement. A) Guide mécanique permettant le dépôt lors de la biofonctionnalisation des ligands sur la puce d'or. B) Puce d'or après avoir réalisé le dépôt, présentant ici 16 zones/spots d'intérêts.

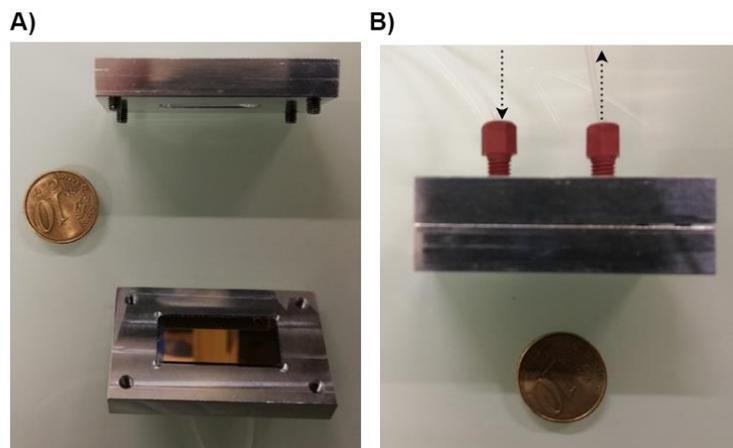


Figure IV.2 – Module NBA. A) Module NBA ouvert, laissant apparaître la puce d'or. B) Module NBA fermé, la puce d'or et la cellule fluidique sont en contact. La connectique fluidique peut alors être branchée sur le support.

I.2. Connexion des modules de tri et de capture : présentation du laboratoire sur puce de séparation et d'immunocapture complet

Une fois les préparations des dispositifs de tri et de capture terminées, une connexion à l'aide d'un capillaire fluide (longueur : 10 cm et diamètre intérieur de 0.5 mm, soit environ 20 μ L) est possible. En effet, afin de réaliser en simultané les deux étapes, la sortie secondaire du dispositif de tri est connectée à l'entrée principale du module NBA, comme illustré Figure IV.3.

Plusieurs points sont à prendre en compte pour le bon déroulement des expériences : (1) les volumes d'échantillons et les volumes filtrés en sortie du dispositif de tri, (2) les volumes morts engendrés par les différents capillaires fluidiques et (3) les contraintes d'utilisations imposées.

- (1) La question des volumes dans le LOC MADNESS s'est posée. En effet, dans le but de répondre au cahier des charges (50 μ L de solution minimum injecté dans le module de capture et temps d'interaction d'une quarantaine de minutes à la surface de la puce d'or), nous avons choisi d'injecter 50 μ L d'échantillon dans le laboratoire sur puce complet. Ce volume, filtré dans un premier temps par le dispositif de tri, s'écoulera en moins d'une heure dans la puce d'immunocapture.
- (2) Puis nous avons déterminé la longueur du capillaire fluide présent entre les deux modules, en connaissant le débit en sortie secondaire du dispositif de tri. En effet, le temps de remplissage de ce volume mort devra être pris en compte dans la durée totale de l'expérience. Nous avons opté pour un capillaire court (10 cm de long et 0.5 mm de diamètre intérieur) mais nous permettant toutefois de manipuler facilement les dispositifs respectifs. Ainsi, son temps de remplissage sera inférieur à 10 minutes, ce qui n'affectera pas trop le temps de contact de l'échantillon à analyser sur la puce d'or.
- (3) Afin de vérifier le débit en sortie du dispositif de capture, lors de chaque expérience, une solution de PBS-Tween20 est collectée dans un contenant en sortie du module NBA. Cette solution est pesée (avant l'injection puis après un temps de collecte de 10 minutes) et nous permet ainsi de déterminer le débit, sur cette durée de temps définie. Ainsi, nous avons pu constater que ce dernier est stable et correspond à la valeur attendue de 1 μ L/min. Il est important de vérifier qu'aucune bulle d'air ne se forme lors des injections. En effet, en plus de perturber le bon déroulement de l'étape de filtration, celle-ci provoquerait des interactions non spécifiques lors de l'étape de capture. Ainsi, une attention toute particulière est portée à ce phénomène. Dans le cas où une bulle se présenterait, l'expérience serait stoppée afin d'évacuer celle-ci.

Les étapes de remplissage, pour toutes les expériences menées, se déroulent comme suit :

T = 0 minute	Injection de PBS-Tween 20 - pression : 1 bar
T = 10 minutes	Début de l'injection de l'échantillon à analyser - pression : 1 bar
T = 55 minutes	Injection de PBS-Tween 20 - pression : 1 bar
T = 70 minutes	Déconnexion des modules de tri et de capture

Tableau IV.1 - Protocole de préparation du LOC MADNESS (temps d'injection et conditions d'utilisation).

De plus, une fois les deux modules séparés, des étapes de lavage de la puce de capture et de fixation des NPs sont appliquées sur la plateforme NBA et sont données dans le tableau en Annexe IV.1.

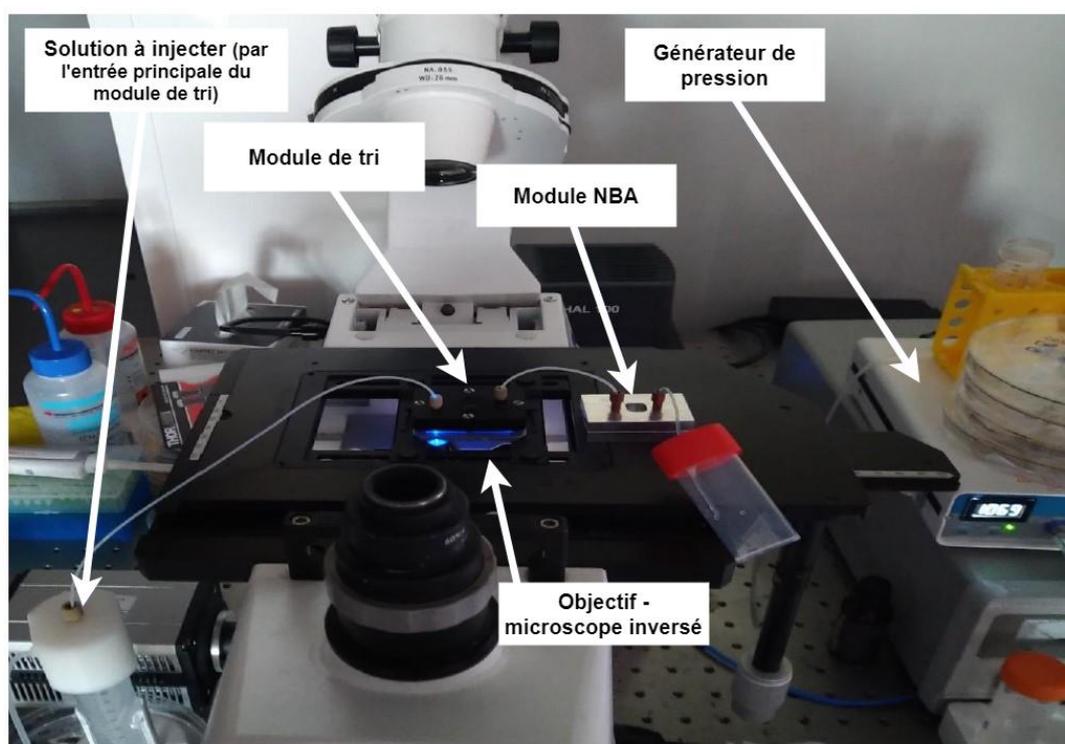


Figure IV.3 – Banc expérimental de test : connexion du module de tri, placé sous l'objectif d'un microscope inversé à fluorescence, et du module NBA par un capillaire microfluidique. La solution est injectée par l'entrée principale du dispositif de tri à l'aide d'un contrôleur de pression (Fluigent MFCS-EZ).

II. Tri et capture de mélanges contenant des NPs, présentation des conditions expérimentales de complexité croissante

La description de l'ensemble des expériences dans le module de tri et de capture connectés, est donnée dans cette partie. Afin d'évaluer les performances du dispositif complet et le possible impact du couplage, des expériences ont été préalablement réalisées sur les puces d'immunocapture seules par SPRi. Ces premiers essais ont été effectués dans des conditions de flux mimant celles qui seront appliquées dans le cas du LOC complet, afin d'appréhender les comportements des différentes nanoparticules sur l'interface de capture et ainsi de définir un protocole adapté (lavage, débit, etc...). Puis de façon classique, les tests de filtration et capture ont été réalisés à partir de solutions modèles de mélanges de nanoparticules NPs synthétiques utilisées précédemment (1) diluées en PBS-Tween20, puis (2) diluées dans des échantillons biologiques possédant des complexités croissantes (PPL et plasma sanguin à différentes concentrations).

II.1. Présentation des expériences réalisées par SPRi en conditions idéales

Pour réaliser ces expériences témoins, la première étape consiste en la préparation des échantillons témoins. Pour cela, des solutions contenant des NP 480-OVA (à une concentration de 3.10^7 particules/mL) et NP 140-CAS (à une concentration de 2.10^8 particules/mL) dans du PBS-Tween20 ont été préparées. Cette préparation, d'une quantité de 1 mL, est alors injectée dans le module NBA pendant une vingtaine de minutes. Lors de ces essais, la biopuce d'or possède le pattern de spots défini en Figure IV.4A, c'est-à-dire : deux spots anti-OVA, deux spots anti-CAS et deux spots RSA. Cette architecture permet, ainsi, la capture spécifique des NP 480-OVA et NP 140-CAS. Le spot RSA est un spot contrôle, en effet, la présence de NPs sur ce dernier indiquerait une mauvaise étape de capture. Après l'injection de la solution de nanoparticules, une étape de lavage suivant un protocole adéquat (un flush à fort débit, suivi de trois cours lavages de 30 secondes à l'eau à 20 μ L/min) est appliquée. Comme observé en Figure IV.4B, la capture des différentes NPs s'est déroulée de manière spécifique (pas d'observation de signal sur les spots RSA). Toutefois, la présence de traînées, très importantes, sur des spots anti-OVA pourrait laisser penser à (1) de possibles interactions non spécifiques sur ces spots ou (2) du relargage des spots anti-CAS lors du rinçage de la biopuce. Ceci pourrait être expliqué par le faible débit d'injection dans la biopuce d'or, favorable à une capture non spécifique et à l'hypothèse d'une sédimentation plus rapide des nanoparticules en surface de celle-ci.

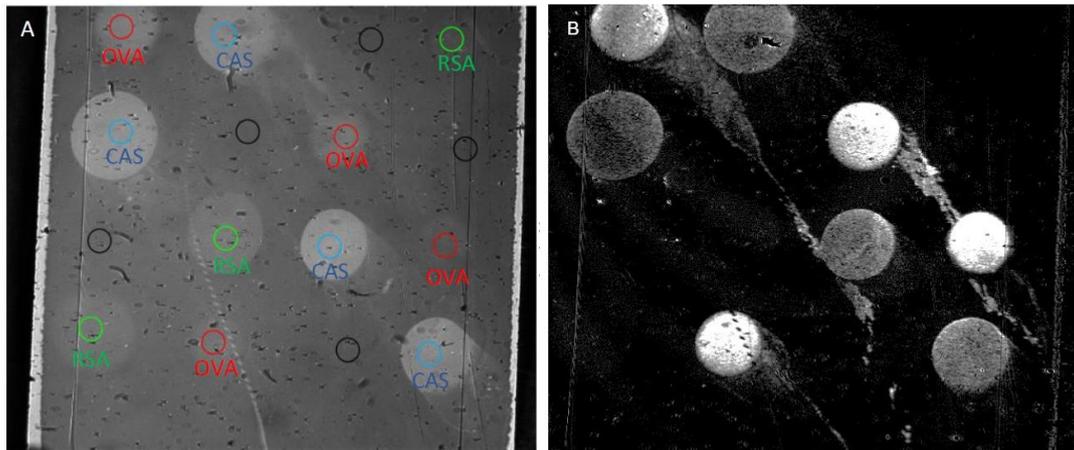


Figure IV.4 - Injection dans la plateforme NBA d'un mélange de NP 140-CAS à une concentration de $2 \cdot 10^8$ particules/mL et NP 480-OVA $3 \cdot 10^7$ particules/mL, à $1 \mu\text{L}/\text{min}$. A) Image SPRi des différents spots, en triplicat, greffés sur la puce d'or (spot anti-OVA en rouge, anti-CAS en bleu et RSA en vert) avant les injections. B) Après injection et capture, image SPRi de la biopuce.

Une fois les lavages terminés et après capture des NPs, la biopuce d'or peut alors être récupérée afin de passer à l'étape suivante consistant en la caractérisation des spots par imagerie AFM. Cette étape permet de déterminer le nombre ainsi que le type de particules piégées à la surface des différents spots. Le traitement des données obtenues lors de la caractérisation des différents spots, permet d'obtenir une collection d'image de ces zones d'intérêt (Figure IV.5). A partir de ces informations, une méthode de comptage, non décrite dans ce document, permet d'obtenir les différents taux de captures (spécifiques et non spécifiques) et ainsi de déterminer les densités surfaciques des particules piégées sur les différentes zones d'intérêts (thèse de Daniel Guneyusu).

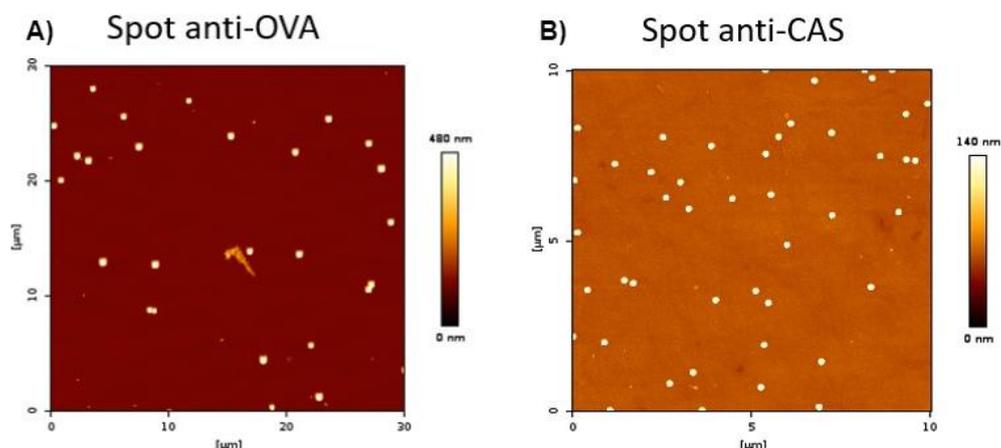


Figure IV.5 – Analyse des spots d’immunocapture, après injection du mélange des NP 140-CAS à une concentration de 2.10^8 particules/mL et 480-OVA 3.10^7 particules/mL, en conditions idéales ($1 \mu\text{L}/\text{min}$, temps de contact d’une heure) par microscopie à force atomique. Images représentatives de deux familles de spots. A) Anti-OVA. B) Anti-CAS. Pour une famille de spot, minimum de 15 images enregistrées.

Plateforme NBA - Conditions idéales (PBS-Tween20)	Spot anti-OVA	Nombre de NP/mm ²
	NP 480-OVA (spécifique)	38 500 particules/mL \pm 29 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	16 222 particules/mL \pm 31 %
	Spot anti-CAS	Nombre de NP/mm ²
	NP 140-CAS (spécifique)	430 000 particules/mL \pm 9 %
NP 480-OVA (non spécifique)	4 000 particules/mL	

Tableau IV.2 - Présentation des densités surfaciques de piégeage, spécifique et non spécifique, des NP 480-OVA et NP 140-CAS lors des expériences en conditions idéales et sur plateforme NBA.

Ces résultats préliminaires, obtenus à l’aide du module NBA fonctionnant seul, mettent en évidence une forte présence des NPs sur leurs spots de capture respectifs. Toutefois, il est à noter (1), une possible contamination par les NP 140-CAS des spot anti-OVA justifiant la densité surfacique non négligeable obtenue lors de l’analyse des spots anti-OVA et (2) une faible interaction des NP 480-OVA sur les spots anti-CAS, comme attendu. Ainsi, ces premiers résultats vont nous servir de comparatif lors des prochaines expériences réalisées dans le cadre des modules de tri et de capture couplés.

II.2. Présentation des expériences réalisées avec le LOC complet

Cette partie décrit les premiers essais menés dans le cas de la connexion des modules de tri et de capture. Pour cela, des préparations simples, contenant un mélange de trois nanoparticules (NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920) dans du PBS-Tween20 sont réalisées. Les résultats des taux de capture de densité surfacique obtenus seront, par la suite, comparés aux études menées sur la plateforme NBA seule. Aussi, ces premières expériences permettront d'évaluer une potentielle perturbation engendrée par la connexion des deux modules.

Lors de la réalisation de ces nouveaux essais, deux points sont toutefois à souligner. Tout d'abord, la concentration des NP 140-CAS a été diminuée ($5 \cdot 10^7$ particules/mL au lieu de $2 \cdot 10^8$ particules/mL) tandis que celle des NP 480-OVA sera légèrement augmentée ($5 \cdot 10^7$ particules/mL au lieu de $3 \cdot 10^7$ particules/mL) afin de travailler à des concentrations de NPs identiques. De plus, l'ajout des NP 920, non fonctionnalisées, fluorescentes et à plus faible concentration ($1 \cdot 10^7$ particules/mL) permettra de suivre le bon déroulement de la filtration dans le dispositif de tri. Celles-ci ne devraient pas entrer en jeu dans la capture spécifique à la surface de la biopuce d'or du fait qu'aucun ligand adapté n'y est présent.

II.2.a. Résultats de filtration-capture

Après injection et filtration d'une solution de 50 mL, suivi des étapes de lavage préalablement décrites, la biopuce d'or peut être observée au microscope à fluorescence. Il est important de rappeler trois points : (1) les NP 480-OVA sont biofonctionnalisées et fluorescentes, (2) les NP 140-CAS sont également biofonctionnalisées mais non fluorescentes tandis que (3) les NP 920 sont seulement fluorescentes. Ainsi, nous nous attendons à observer uniquement de la fluorescence sur les spots anti-OVA.

Comme on peut l'observer sur la Figure IV.6A, celle-ci est particulièrement importante, laissant interpréter un fort taux de capture des NP 480-OVA contrairement aux spots anti-CAS où aucune fluorescence n'est visible (Figure IV.6B).

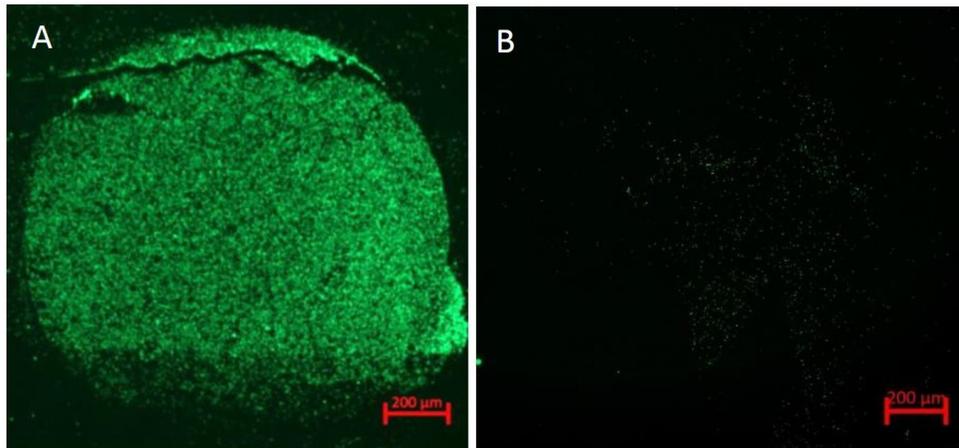


Figure IV.6 – Images, en microscopie à fluorescence (grossissement 5x), des spots de capture d'un échantillon de NPs en PBS-Tween20. A) Spots anti-OVA. B) Spot anti-CAS. (Longueur d'onde 506 / 536 nm, temps d'exposition de quelques millisecondes.)

Les densités surfaciques des NP 480-OVA et NP 140-CAS sont étudiées par imagerie AFM des spot anti-OVA (Figure IV.7) et anti-CAS (Figure IV.8). Ces études ont été réalisées à FEMTO-ST et seront détaillées dans la thèse de Daniel Guneyasu. Nous n'en restituerons ici que les éléments nous permettant de valider, ou non, le fonctionnement du dispositif de séparation et de piégeage complet. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

LOC complet NPs en PBS- Tween20	Spot anti-OVA	Nombre de NP/mm ²
	NP 480-OVA (spécifique)	66 408 particules/mm ² ± 23 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	6 600 particules/mm ² ± 17 %
	Spot anti-CAS	Nombre de NP/mm ²
	NP 140-CAS (spécifique)	138 660 particules/mm ² ± 0.06 %
NP 480-OVA (non spécifique)	6 250 particules/mm ² ± 20 %	

Tableau IV.3 - Densités surfaciques des spots anti-OVA et anti-CAS lors des expériences LOC complet de NPs en PBS.

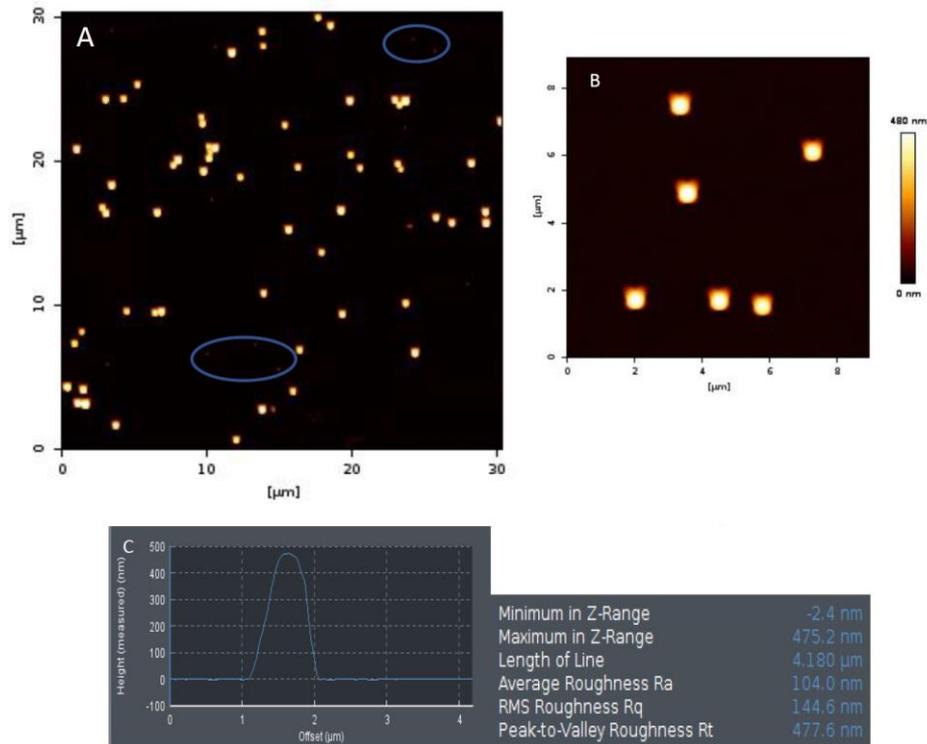


Figure IV.7 – Analyse des spots d’immunocapture par microscopie à force atomique après injection des NP 480-OVA en PBS, dans le LOC complet MADNESS. Image représentative des spots anti-OVA, sur un total d’une quinzaine d’images enregistrées. A) Spot anti-OVA large. B) Zoom sur une zone entourée en bleu et montrant de la capture non spécifique de NP 140-CAS. C) Profil de section des NP 480-OVA.

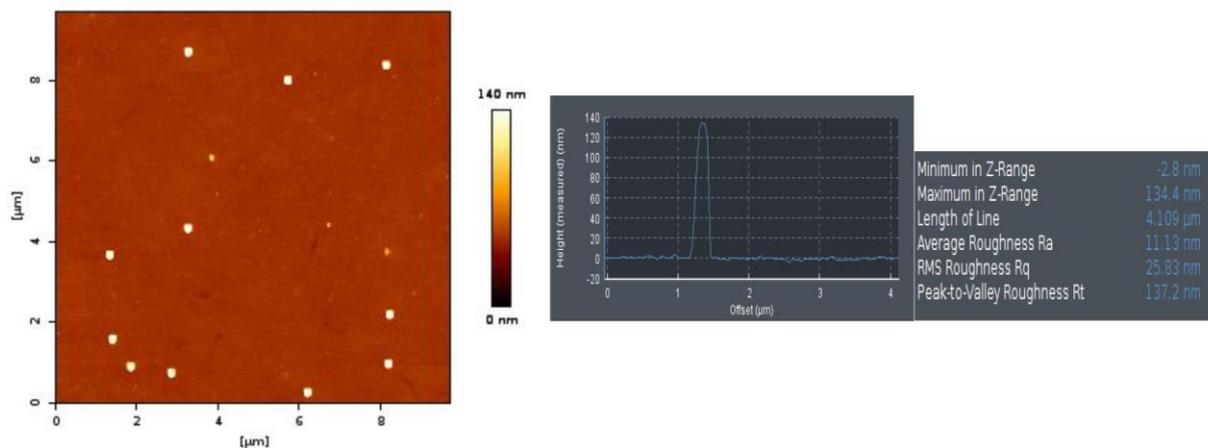


Figure IV.8 - Analyse des spots d’immunocapture par microscopie à force atomique après injection des NP 140-CAS en PBS dans le LOC complet MADNESS. Image représentative des spots anti-CAS, sur un total d’une quinzaine d’images enregistrées. Profil de section des NP 140-CAS.

II.2.b. Comparaison des résultats avec la plateforme NBA et conclusion

Afin de déterminer si la connexion a impacté l'étape de filtration, une comparaison des taux de capture obtenus dans le cas du module NBA seul et lors de la connexion des deux modules a été réalisée. Toutefois, la concentration utilisée lors des expériences réalisées sur la plateforme NBA étant différente de celle utilisée en filtration-capture, une réévaluation de ces densités surfaciques, pour les mesures en SPRi seule, a été appliquée. Il a été considéré, en première approximation, que les densités surfaciques étaient proportionnelles aux concentrations appliquées. Les résultats sont donnés en Figure IV.9.

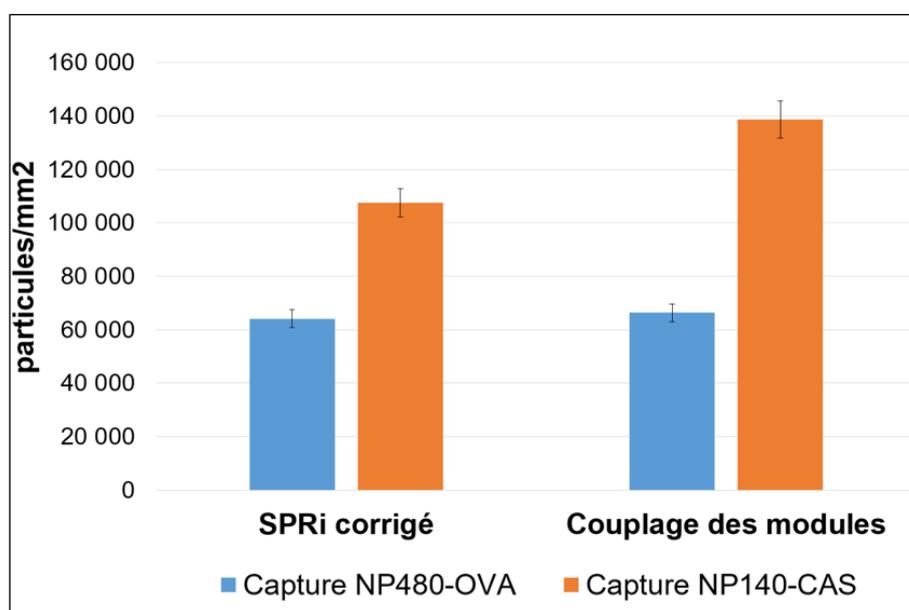


Figure IV.9 - Comparaison des taux de capture des spots anti-OVA (en bleu) et spots anti-CAS (en orange). Les taux « SPRi corrigé » correspondant aux concentrations injectées lors du mélange couplant les modules de tri et de capture. A droite, les tracés des taux « Couplage des modules » présentent les taux de capture des spots anti-OVA et anti-CAS lors de l'expérience couplant les deux modules.

Une comparaison entre les taux « SPRi corrigé » et « Couplage des modules » peut alors être envisagée et nous observons, ainsi, une densité surfacique des NP 480-OVA de même ordre de grandeur et présentant une légère différence pour les NP 140-CAS. Ces premiers résultats encourageants sont en faveur d'une non perturbation de la mesure pour l'étape de filtration.

III. Expériences en milieu biologique : mélange de nanoparticules NPs diluées avec lysat plaquettaire et en plasma

L'étude précédente semble montrer une filtration et une capture de bonne qualité en LOC complet. Les différentes NPs ont donc été testés dans de nouvelles conditions et en présence

de solutions biologiques réelles, c'est-à-dire contenant de nombreuses particules micro et submicroniques (dont les EVs) et des molécules protéiques. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des échantillons de lysat plaquettaire (PPL) fournis par la Taipei Medical University et du plasma sanguin fourni par l'EFS.

Les PPL ont été obtenus à partir de concentrés de plaquettes à l'aide du procédé [103] schématisé en Figure IV.10. Après centrifugation d'un échantillon de concentré de plaquette, le culot est récupéré et remis en suspension et lysé par des étapes successives de congélation et de décongélation. Une nouvelle centrifugation permet la précipitation des débris cellulaires et protéiques du surnageant. C'est dans ce dernier échantillon que les PPL sont récupérés.

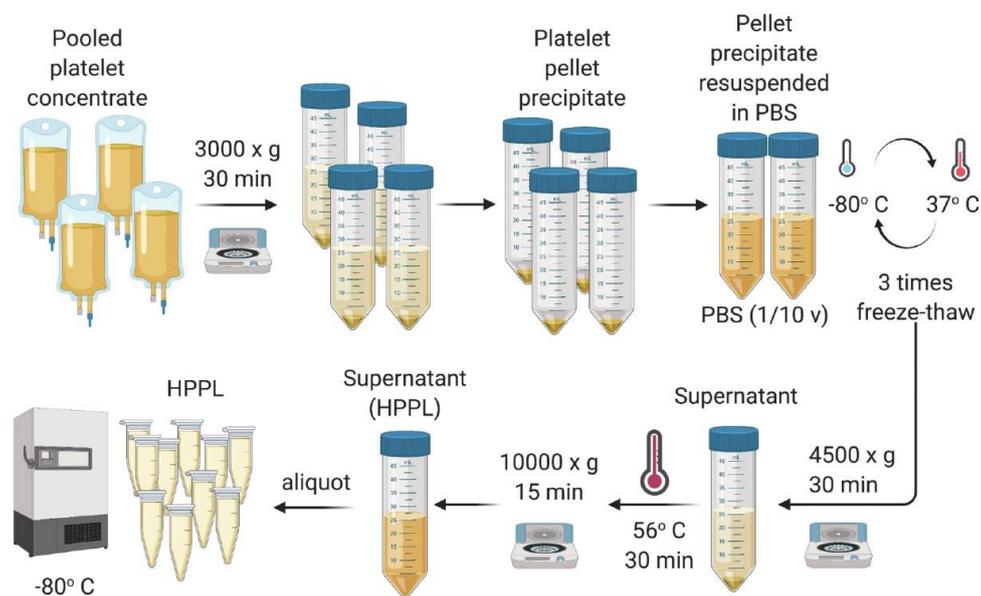


Figure IV.10 – Protocole de préparation des PPL à partir de concentrés de plaquettes, mis en place par Burnouf et al.

Des études préliminaires réalisées ont permis de mettre en évidence la concentration, de l'ordre de $9 \cdot 10^{11}$ particules/mL, et le diamètre moyen, compris entre 80 et 300 nm, des PPL (Thèse de Balabrumaniyam Namasivayam, 2021).

Le plasma utilisé, fourni par l'EFS, possède les mêmes caractéristiques que celui présenté dans le chapitre précédent.

III.1. Étude d'un mélange de NPs en présence de PPL

Les premiers tests, en milieu biologique, ont été réalisés à l'aide de solution de PPL (à une concentration de $9 \cdot 10^8$ particules/mL) en présence de NPs aux concentrations identiques aux

expériences menées en conditions idéales ($5 \cdot 10^7$ particules/mL pour les NP 140-CAS et NP 480-OVA et $1 \cdot 10^7$ particules/mL pour les NP 920). Il est important de noter que, lors de ces nouveaux tests, le pattern des biopuces d'or utilisées se compose de spots (1) anti-OVA, (2) anti-CAS et (3) anti-CD41. En effet, la protéine CD41 (ou GPIIb), responsable de l'agrégation plaquettaire, récepteur du fibrinogène et exprimée sur la membrane des plaquettes, est considérée comme un marqueur des EVs plaquettaires. Ainsi, la capture spécifique de l'échantillon biologique est attendue sur ces zones d'intérêts (spot anti-CD41).

Le suivi, à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence, permet de suivre le bon déroulement dans le module de tri. Les NP 480-OVA (Figure IV.11) sont ainsi bien observées dans l'ensemble du réservoir de ce dernier module, à l'inverse des NP 920 filtrées par celui-ci.

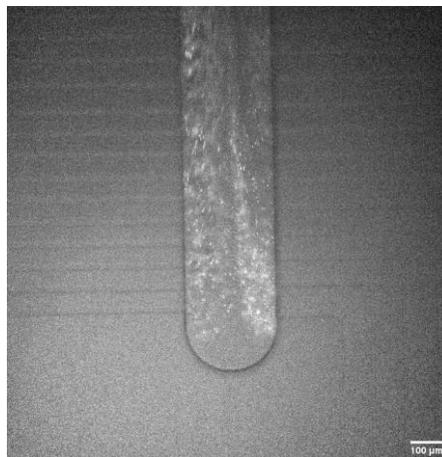


Figure IV.11 - Suivi de l'étape de filtration de la solution. Les NP 480-OVA sont présents en sortie secondaire du dispositif de tri. (Grossissement $\times 10$, après quelques secondes d'injection de la solution, à 1 bar).

Trois expériences de filtration et de capture ont été réalisées dans l'optique d'être comparées. Les échantillons ont été préparés de façon rigoureusement identique, puis injectés à 1 bar dans des dispositifs de tri. Concernant le dispositif de tri, la complexité de la solution, liée en grande partie à la présence du PPL, n'a pas eu d'impact sur l'étape de filtration.

Une fois les différents rinçages appliqués, les observations ont alors été réalisées sur les différentes zones d'intérêts. Une fois encore, seules les NP 480-OVA étant fluorescentes, nous nous attendons à retrouver de la fluorescence sur son spot de reconnaissance seulement. Dans le but de ne pas alourdir ce manuscrit, seule une image d'un spot caractéristique anti-OVA, anti-CAS et anti-CD41 sera donné.

La Figure IV.12A, montre la fluorescence marquée sur un spot anti-OVA, ce qui montre, encore une fois, une capture spécifique des NP 480-OVA. Les deux autres spots, anti-CAS

(Figure IV.12B) et anti-CD41 (Figure IV.12C), indiquent une faible interaction non spécifique des NP 480-OVA sur les autres zones d'intérêts.

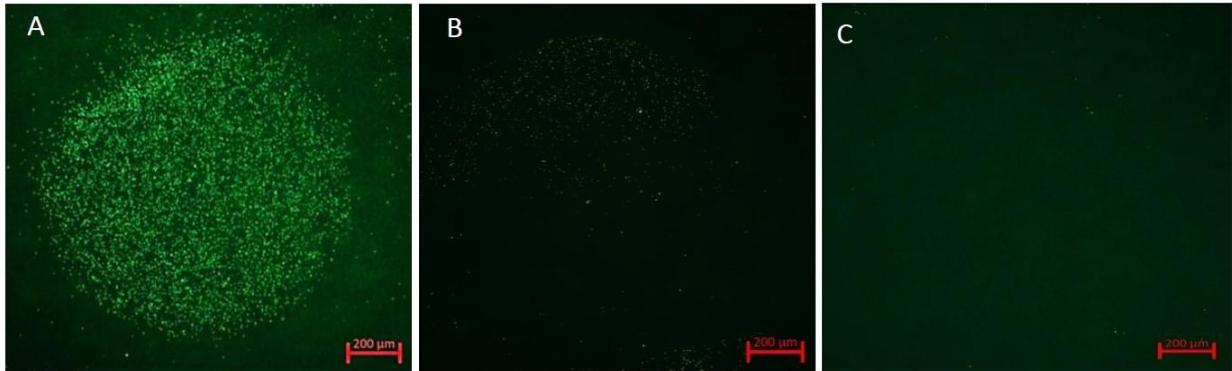


Figure IV.12 - Image en microscopie à fluorescence, (en grossissement x5), des spots de capture, d'un échantillon de NPs en PPL. A) Spot anti-OVA. B) Spot anti-CAS. C) Spot anti-CD41. (Longueur d'onde 506 / 536 nm, temps d'exposition de quelques millisecondes.)

Comme lors des expériences précédentes, les densités surfaciques des NP 480-OVA, NP 140-CAS et des PPL sont étudiées par imagerie AFM des spots respectifs anti-OVA (Figure IV.13A) et anti-CAS (Figure IV.13B) et anti-CD41(Figure IV.13C). Une fois encore, nous n'en restituons ici que les éléments nous permettant de valider, ou non, le fonctionnement du dispositif de séparation et de piégeage complet.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus en milieu non biologique. Ainsi, pour chaque étude, les taux de captures spécifiques et non spécifiques seront donnés.

III.1.a. Présentation des densités surfaciques des différents spots

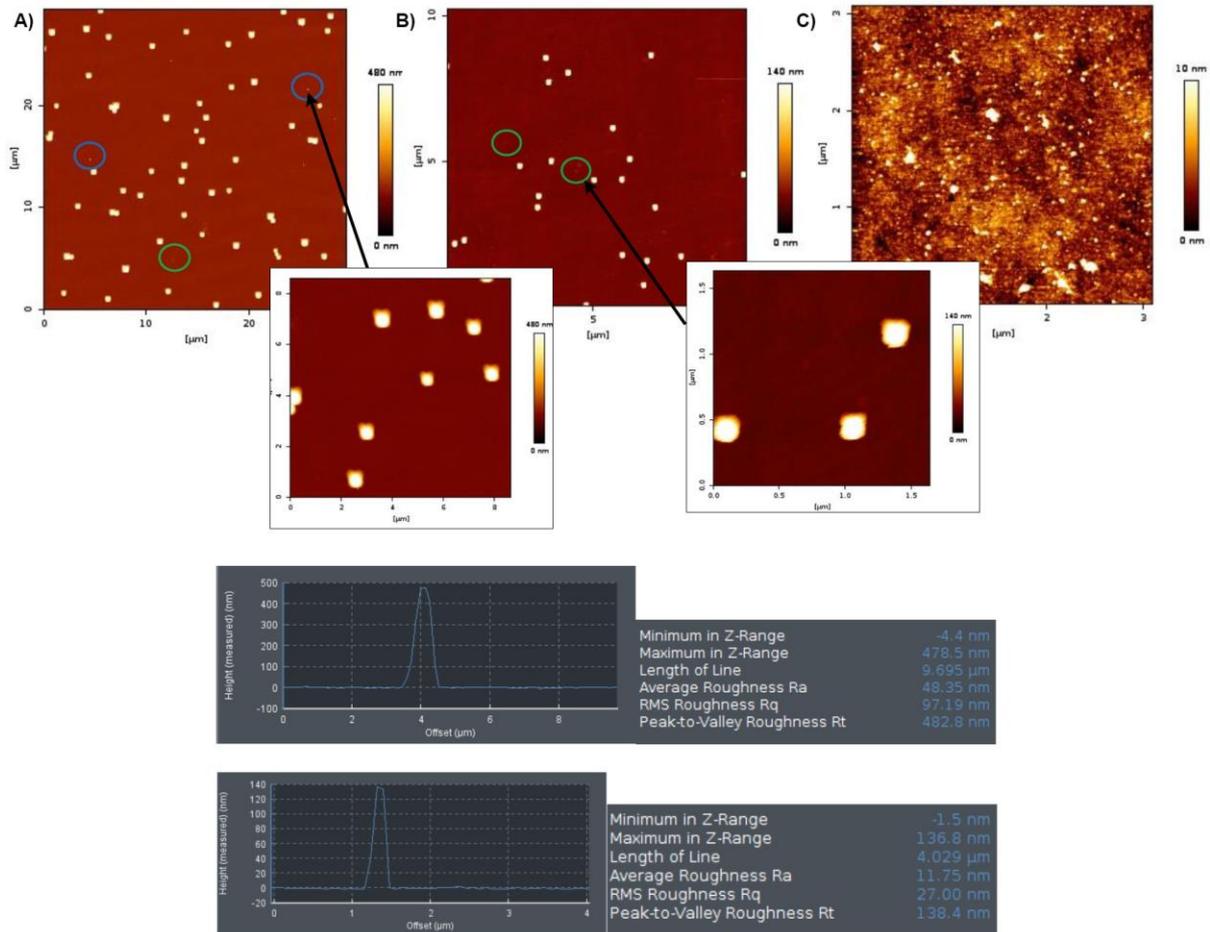


Figure IV.13 - Analyse des spots d'immunocapture après injection des NPs en PPL, par microscopie à force atomique. Image représentative des différents spots, sur un total d'une quinzaine d'images enregistrées. A) Spot anti-OVA large et présence de zones d'interactions non spécifiques entourées en bleu (par les NP 140-CAS) et en vert (par l'échantillon biologique). B) Spot anti-CAS large et présence de zones d'interactions non spécifiques entouré en vert (par l'échantillon biologique). C) Spot anti-CD41 large. Profils de section des NP 480-OVA et NP 140-CAS.

Lors de ces essais menés en PPL, les expériences filtration-capture des tests notés 1 et 2 ont été réalisées en suivant des étapes de lavage indiquées précédemment. Toutefois, en raison des premières observations en fluorescence de ces puces d'or, il a été choisi d'appliquer un débit plus fort ainsi qu'un temps plus court de lavage sur le module NBA, afin de permettre une éventuelle meilleure capture lors du dernier essai mené.

Densités surfaciques des spots anti-OVA en PPL

Expérience	Anti-OVA	Nombre de NP/mm²
1	NP 480-OVA (spécifique)	8 854 particules/mm ² ± 0.5 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	975 particules/mm ² ± 23 %
2	NP 480-OVA (spécifique)	12 906 particules/mm ² ± 1 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	2 550 particules/mm ² ± 10 %
3	NP 480-OVA (spécifique)	61 263 particules/mm ² ± 7 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	3 500 particules/mm ² ± 20 %

Tableau IV.4 - Densités surfaciques de piégeage sur les spots anti-OVA, obtenues lors des expériences en PPL sur LOC complet.

Les résultats des densités surfaciques des spots anti-OVA soulèvent les questions (1) d'une hétérogénéité de la capture spécifique sur les trois expériences menées et (2) d'une présence d'une capture non spécifique des NP 140-CAS non négligeable sur ces zones.

Les tests 1 et 2, été opérés avec des étapes de lavage similaires, montrent un faible taux de capture des NP 480-OVA bien plus faible que le test 3. Une hypothèse pour expliquer ce résultat serait que le protocole appliqué lors du troisième test est plus adapté et favoriserait une capture spécifique.

Densités surfaciques des spots anti-CAS en PPL

Expérience	Anti-CAS	Nombre de NP/mm²
1	NP 140-CAS (spécifique)	225 278 particules/mm ² ± 3 %
	NP 480-OVA (non spécifique)	3 600 particules/mm ² ± 39 %
2	NP 140-CAS (spécifique)	108 875 particules/mm ² ± 18 %
	NP 480-OVA (non spécifique)	3 100 particules/mm ² ± 3 %
3	NP 140-CAS (spécifique)	165 715 particules/mm ² ± 15 %
	NP 480-OVA (non spécifique)	7 700 particules/mm ² ± 8 %

Tableau IV.5 - Densités surfaciques de piégeage des spots anti-CAS, obtenues lors des expériences en PPL sur LOC complet.

Les densités surfaciques des NP 140-CAS obtenues mettent en avant (1) un taux supérieur pour les expériences 1 (augmentation de 62 %) et 3 (augmentation de 20 %) et (2) un taux inférieur lors de l'expérience 2 (perte de 20 %), comparées à celles récoltées en PBS-

Tween20. Aussi, la capture non spécifique très élevée sur l'ensemble des spots anti-CAS semble indiquer la présence de NP 480-OVA. Une fois encore, des hypothèses liées à l'étape de rinçage ou à la dénaturation de l'échantillon sont possibles.

Densités surfaciques des spots anti-CD41 en PPL

Expérience	Anti-CD41	Nombre de NP/mm²
1	CD-41 (spécifique)	5 221 264 particules/mm ² ± 18 %
2	CD-41 (spécifique)	20 571 120 particules/mm ² ± 12 %
3	CD-41 (spécifique)	7 553 640 particules/mm ² ± 46 %

Tableau IV.6 - Densités surfaciques de piégeage des spots anti-CD41, obtenues lors des expériences en PPL sur LOC complet.

Les densités surfaciques des spots anti-CD41 montrent une disparité dans les résultats. L'expérience 2 montre une densité très élevée, presque quatre fois supérieure aux densités des deux autres expériences. Ce résultat tendrait à supposer une plus grande quantité d'échantillon biologique dans cet échantillon, car chaque échantillon a été préparé en utilisant des aliquots de PPL différents. Toutefois, il est aussi possible d'imaginer une détérioration de ce dernier en raison de l'écart significatif des densités surfaciques.

III.1.b. Comparaison des expériences en PPL et en PBS

Afin d'analyser un changement de comportement des dispositifs de tri et de capture, les densités surfaciques des spots anti-OVA et anti-CAS obtenues lors des expériences en conditions idéales (NPs en PBS-Tween20) et celles en milieux biologiques (NPs en PPL) ont été comparées (Figure IV.14).

Nous pouvons soulever plusieurs points. Pour les deux premières expériences, les densités surfaciques des NP 480-OVA sont 8 à 5 fois moins importantes, sur leurs spots, comparées aux précédents tests en PBS-Tween20. Toutefois, les résultats obtenus lors de la troisième expérience semblent être proches des conditions idéales (perte de 8 %). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : (1) une non homogénéité des solutions préparées, (2) une perturbation de la capture des NP 480-OVA sur leurs spots respectifs pouvant être engendrée lors de l'étape de rinçage (débit trop fort) ou (3) à une dénaturation de l'échantillon au cours de l'expérience. Concernant les NP 140-CAS, les taux semblent moins sujets à de fortes variations (seule une expérience présente une augmentation de plus de 60 %). L'expérience 3 semble montrer qu'il n'y a pas de raison fondamentale à ce que la filtration ait eu un impact sur l'étape de piégeage mais également que la nature de l'échantillon ne perturbe pas le bon

déroulement de la filtration. Par contre, la variabilité des résultats montre clairement qu'il est difficile de conclure, en particulier, sur la qualité du protocole complet.

De plus, la préparation des PPL étant effectuée à partir de précipités de pellets plaquettaires remis en suspension dans du PBS, et compte tenu de la concentration en PPL, nous pouvons supposer que la viscosité liée à la présence d'éléments biologique n'est que peu modifiée. Ainsi, dans ce milieu biologique, le mécanisme de la filtration ne devrait pas être modifié. Par contre, l'hypothèse d'interactions non spécifiques entre des éléments biologiques et des NPs est non négligeable. Ainsi, les NPs pourraient s'agglomérer avec ces derniers, rendant leur capture sur leurs spots respectifs difficile voire impossible.

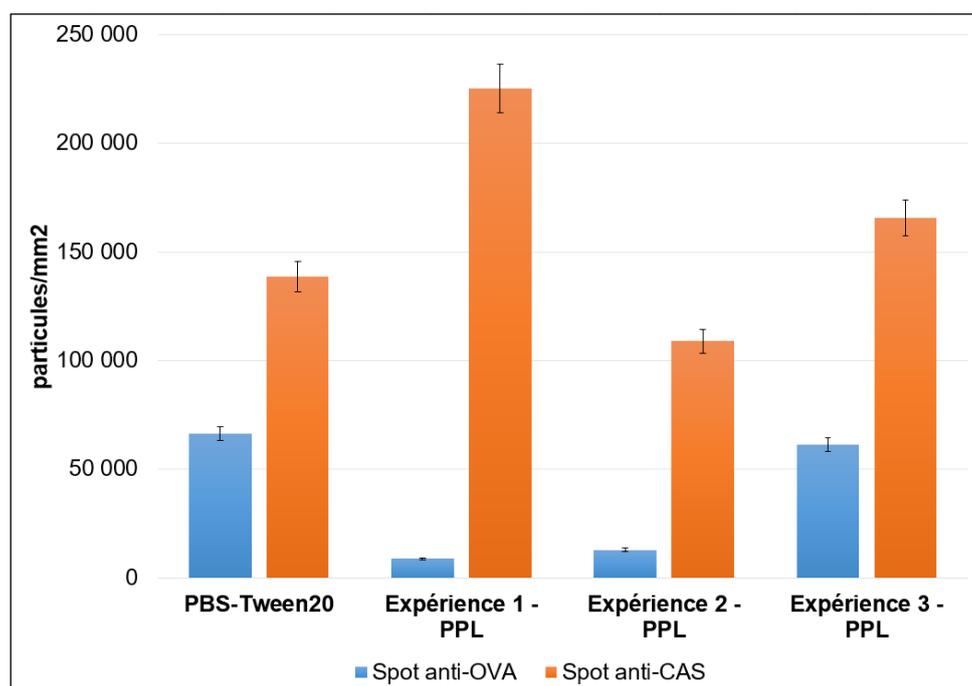


Figure IV.14 - Comparaison des densités surfaciques des NP 480-OVA (en bleu) et NP 140-CAS (en orange) lors de l'analyse en conditions idéale (PBS-Tween20) et dans un milieu biologique (Expérience – PPL).

III.2. Étude d'un mélange de NPs et de plasma

Deux nouveaux tests ont été réalisés à partir de plasma sanguin. Ces préparations contiennent également des NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920 aux concentrations identiques à celles utilisées lors des expériences précédentes. Dans le but d'étudier l'influence du milieu sur le procédé complet de filtration et de piégeage, deux dilutions de plasma sanguin ont été utilisées : une dilution par 1000 et une dilution par 10.

Pour des raisons de consommables (quantité des biopuces d'or disponible) et d'échantillon biologique (préparation d'un volume important à analyser), seulement un test, dans les deux conditions indiquées précédemment, a pu être réalisé lors des essais. Aussi, de nouveaux tests permettraient de confirmer ces premiers résultats.

Les différentes étapes de filtration, capture et rinçage des deux préparations contenant du plasma sanguin aux dilutions 1000 et 10 ayant été réalisées, des premières observations au microscope à fluorescence (Figures IV.15 et IV.16) ont été effectuées. Les spots anti-OVA (Figures IV.15A et IV.16A) et anti-CAS (Figures IV.15B et IV.16B), pour les deux conditions de concentration de l'échantillon biologique, semblent posséder des intensités de fluorescence proches. Ceci tendrait ainsi à indiquer une capture spécifique des NP 480-OVA sur leurs zones d'intérêt. Toutefois, après filtration du plasma dilué 10 fois, le spot anti-CD41 en Figure IV.16C, contrairement au spot Figure IV.15C, présente des zones de fluorescence. Cette première information pourrait suggérer une capture non spécifique de NP 480-OVA lors de cette seconde analyse.

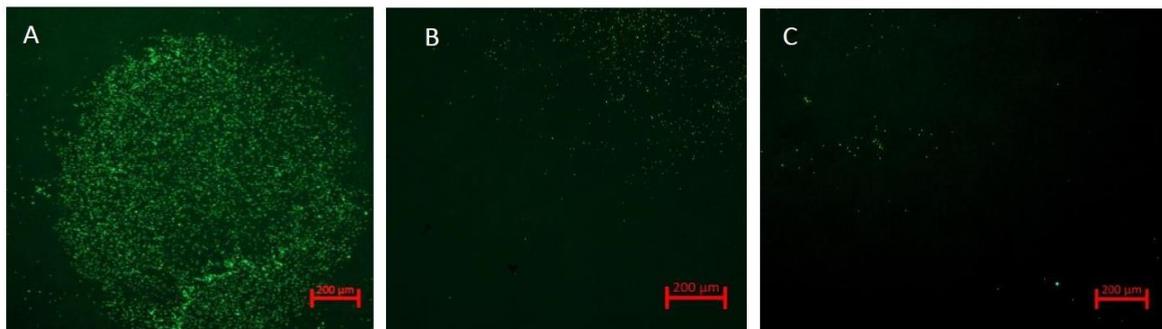


Figure IV.15 - Image en microscopie à fluorescence, (en grossissement $\times 5$), des spots de capture de la puce d'or, d'un échantillon de NPs en plasma dilué 1000 fois. A) Spot anti-OVA. B) Spot anti-CAS. C) Spot anti-CD41. (Longueur d'onde 506/536 nm, temps d'exposition de quelques millisecondes.)

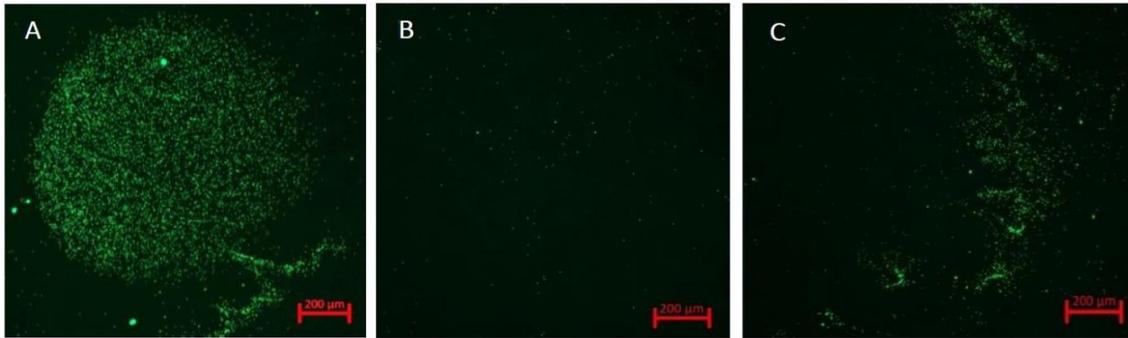


Figure IV.16 - Image en microscopie à fluorescence, (en grossissement $\times 5$), des spots de capture de la puce d'or, d'un échantillon de NPs en plasma dilué 10 fois. A) Spot anti-OVA. B) Spot anti-CAS. C) Spot anti-CD41. (Longueur d'onde 506/536 nm, temps d'exposition de quelques millisecondes.)

Afin de déterminer plus précisément l'influence de la concentration du milieu biologique lors des essais réalisés en plasma sanguin, une étude par imagerie AFM des différents spots des biopuces d'or a été réalisée. Une fois encore, ces analyses permettront de déterminer les densités surfaciques de l'ensemble des NPs sur les zones d'intérêts.

Des images représentatives des familles des spots anti-OVA anti-CAS et anti-CD41, en imagerie à force atomique, complètent l'analyse des échantillons de plasma dilué 1000 fois (Figure IV.17) et de plasma dilué 10 fois (Figure IV.18).

Toutefois, l'étude AFM des spots anti-CD41 ne montrant que très peu de capture, leur analyse ne sera pas donnée dans ce document. En effet, une hypothèse envisageable serait la non spécificité des ligands utilisés en présence de plasma sanguin.

III.2.a. Présentation des densités surfaciques des différents spots

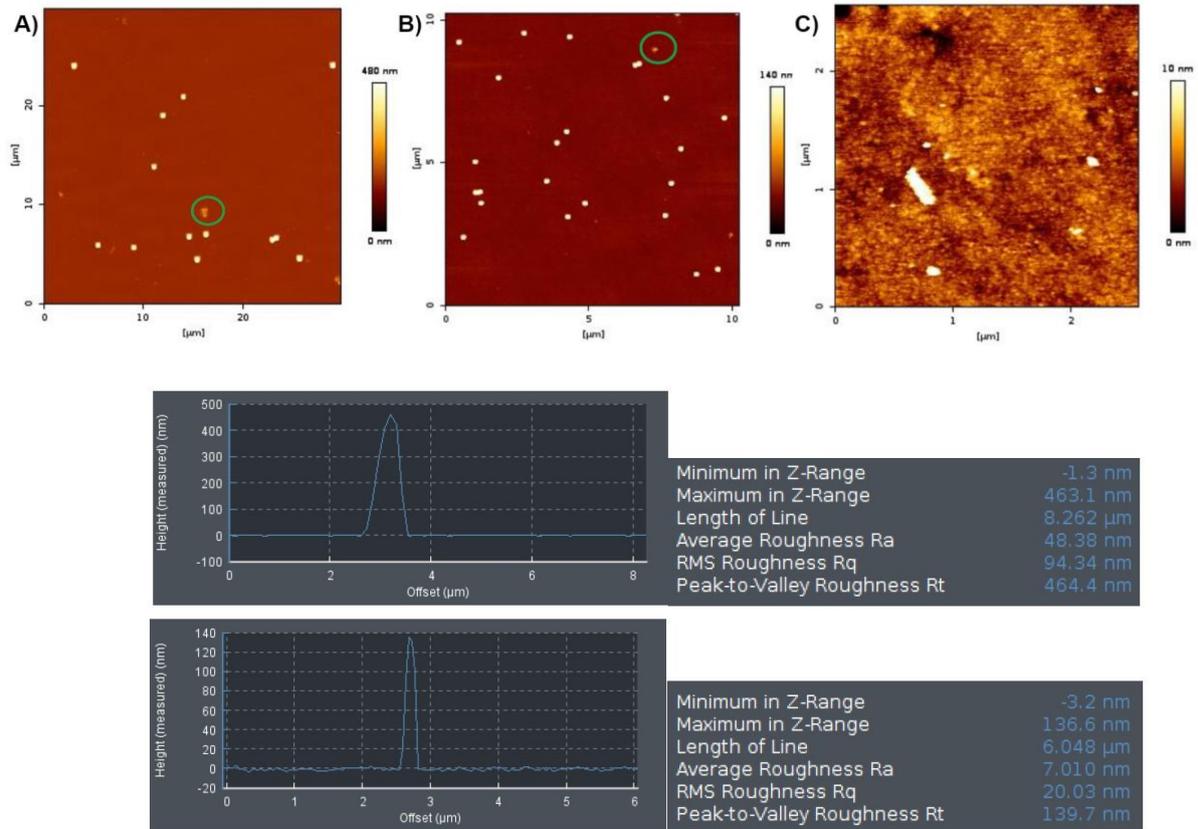


Figure IV.17 - Analyse des spots d'immunocapture après injection des NPs en plasma dilué 1000, le laboratoire sur puce MADNESS par microscopie à force atomique. Image représentative des différents spots, sur un total d'une quinzaine d'images enregistrées. A) Spot anti-OVA présentant des zones d'interactions non spécifique en vert. B) Spot anti-CAS, présence de zones d'interactions non spécifique entourées en vert. C) Spot anti-CD41 large.

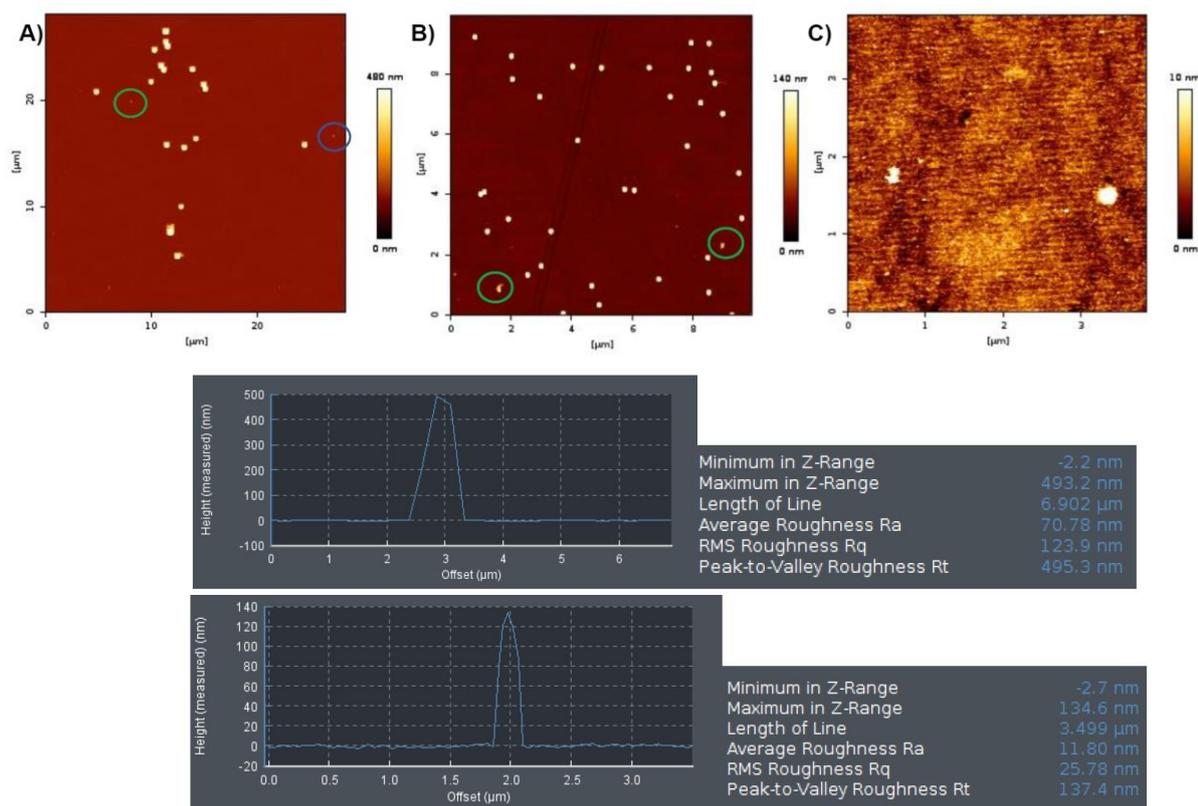


Figure IV.18 - Analyse des spots d'immunocapture après injection des NPs en plasma dilué 10, le laboratoire sur puce MADNESS par microscopie AFM. Image représentative des différents spots, sur un total d'une quinzaine d'images enregistrées. A) Spot anti-OVA et zones d'interactions non spécifiques en vert. B) Spot anti-CAS et présence de zones d'interactions non spécifiques. C) Spot anti-CD41.

Dilution par 1000 du plasma	Anti-OVA	Nombre de NP/mm ²
	NP 480-OVA (spécifique)	11 464 particules/mm ² ± 6 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	1 350 particules/mm ² ± 11 %
	Anti-CAS	Nombre de NP/mm ²
	NP 140-CAS (spécifique)	267 500 particules/mm ² ± 3 %
NP 480-OVA (non spécifique)	2 900 particules/mm ² ± 14 %	

Tableau IV.7 - Densités surfaciques des spots anti-OVA et anti-CAS, obtenues lors des expériences en plasma dilué 1000 fois sur LOC MADNESS.

Dilution par 10 du plasma	Anti-OVA	Nombre de NP/mm²
	NP 480-OVA (spécifique)	10 320 particules/mm ² ± 7 %
	NP 140-CAS (non spécifique)	900 particules/mm ² ± 11 %
	Anti-CAS	Nombre de NP/mm²
	NP 140-CAS (spécifique)	303 889 particules/mm ² ± 1 %
	NP 480-OVA (non spécifique)	2 250 particules/mm ² ± 47 %

Tableau IV.8 - Densités surfaciques des spots anti-OVA et anti-CAS, obtenues lors des expériences en plasma dilué 10 fois sur LOC MADNESS.

L'étude de la densité des spots anti-OVA, en présence de deux dilutions de plasma sanguin sont proches (moins de 10 % de différence) et met en avant une capture spécifique des NP 480-OVA sur ces zones. Toutefois, il est à noter la de capture non spécifique pouvant indiquer la présence de quelques NP 140-CAS sur ces spots. Malgré cela, les densités surfaciques obtenues pour les spots anti-OVA permettraient de mettre en avant une non influence de la concentration du milieu biologique sur la filtration puis la capture des NP 480-OVA.

Les densités surfaciques des spots anti-CAS des biopuces, lors des expériences en plasma sanguin dilué 1000 et 10 fois, montrent une capture spécifique des NP 140-CAS sur ces derniers. Cependant, la densité obtenue pour la capture des NP 140-CAS lors de l'expérience en milieu biologique plus concentré, est plus importante (environ 12 %) que celle obtenue dans du plasma dilué 1000 fois. Les NP 140-CAS étant en proportion identique dans les deux solutions, nous nous attendons à les retrouver en même quantité. Ceci pourrait provenir d'une non homogénéité des échantillons ou d'une interaction du milieu biologique avec les nanoparticules. Aussi, la présence de NP 480-OVA sur ces spots indique une capture non spécifique, en plus faible proportion.

III.2.b. Comparaison des densités surfaciques des échantillons en plasma sanguin et en PBS-Tween20

Dans le but d'étudier l'influence du milieu biologique sur la filtration et la capture, les résultats présentés ci-dessus ont été comparés à ceux obtenus dans le cas d'une solution en PBS-Tween20. Une fois encore, les conditions d'expérimentations (concentrations des NPs, débit appliqué, méthode de rinçage) ont été inchangées afin de comparer, le plus strictement possible, les expériences.

La comparaison des densités surfaciques (Figure IV.19) obtenues lors de l'étude d'un échantillon en PBS-Tween20 et en plasma sanguin montre (1) une diminution importante de la capture des NP 480-OVA sur leurs spots spécifiques et (2) une augmentation significative

de la capture des NP 140-CAS sur les zones anti-CAS. En effet, les densités surfaciques des spots anti-OVA présentent une différence de l'ordre de 83 à 84 % comparées à celles obtenues en PBS-Tween20. Toutefois, la capture des NP 480-OVA, lors des expériences en plasma, semble identique (moins de 10 %), quel que soit la dilution du plasma.

Aussi, contrairement aux NP 480-OVA, les densités surfaciques des spots anti-CAS, en plasma, montrent une augmentation comprise en 48 et 54 %, comparées au PBS-Tween20. Une légère différence (environ 12 %) entre les densités obtenues en plasma est toutefois à prendre en compte.

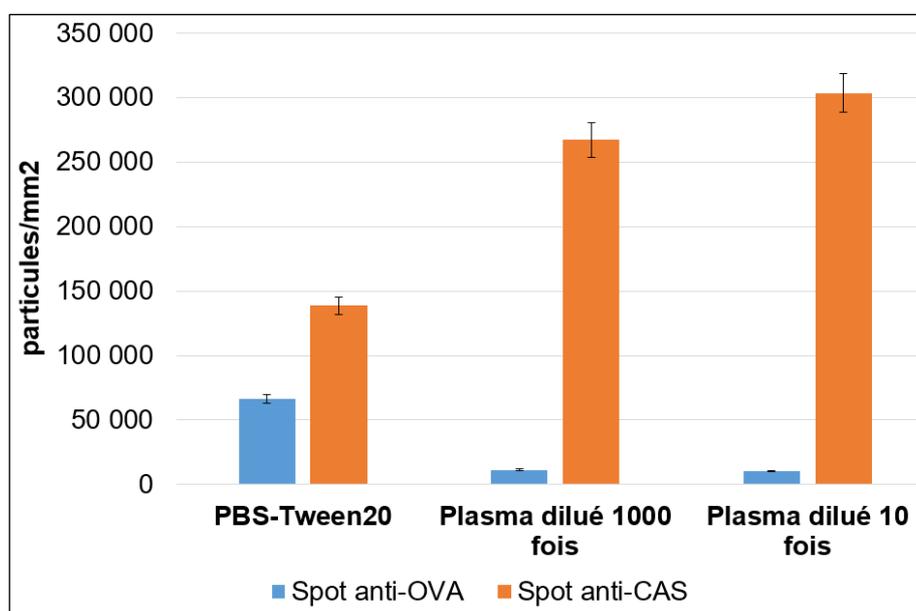


Figure IV.19 - Comparaison des densités surfaciques des NP 480-OVA (en bleu) et NP 140-CAS (en orange) lors de l'analyse en conditions idéale (PBS-Tween20) et dans un milieu biologique (Expérience – Plasma dilué 1000 et 10 fois).

Les échantillons de plasma dilué 1000 fois et 10 fois présentent des viscosités étant différentes. En effet, les captures respectives des spots anti-OVA et anti-CAS représentés sur la Figure IV.19 ne semblent pas affectées par la différence de viscosité imposée par les échantillons biologiques. Une fois de plus, cette information tendrait à dire que le mécanisme de filtration n'est pas affecté par la présence de plasma. Toutefois, encore une fois, il est possible d'imaginer des interactions non spécifiques entre les NPs et des éléments biologiques présents dans le plasma qui pourraient bloquer la capture spécifique des NPs sur leurs spots respectifs. Aussi, cette interaction NP 480-OVA-élément biologiques pourrait engendrer la formation de nanoéléments de taille supérieure au rayon de coupure du dispositif de tri et donc leur filtration.

Les différences observées entre les résultats en PBS-Tween20 et en plasma sont à ce stade difficilement complètement interprétables. Toutefois, les densités surfaciques étant proches lors des analyses en plasma sanguin, on peut en déduire que la variation de la viscosité, ou la densité du milieu, n'affectent pas la filtration. Une première hypothèse semble être que la matrice biologique n'affecte pas la filtration de l'échantillon. Toutefois, les expériences n'ayant été réalisées qu'une seule fois, un triplicat des expériences pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

IV. Conclusion et perspectives

Les expériences de filtration et de capture de nanoparticules NPs ont tout d'abord été menées de façon parallèle sur les modules de tri et de capture dans les laboratoires respectifs et leur fonctionnement individuel, a été démontré. Toutefois, le projet porté par MADNESS met en avant le développement d'une solution, couplant ces deux modules, permettant ainsi l'isolement et la capture de particules submicroniques. Ainsi, dans le but de répondre à ces attentes, la connexion entre ces modules a été réalisée. Des premières expériences, en conditions idéales (NP 140-CAS, NP 480-OVA et NP 920) ont permis d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus dans le cas d'un module de capture seul. Ces résultats préliminaires montrent (1) une séparation dans le module de tri attendue et (2) une non influence de ce dernier sur l'efficacité et les rendements de la capture.

De plus, l'analyse de la puce d'or n'a pas été impacté par la présence de NP 920, montrant l'élimination en grande partie de celles-ci lors du passage dans le dispositif de tri. Ces résultats montrent ainsi que ni le dispositif de filtration, ni le module NBA, ne sont affectés par cette connexion. Ces résultats encourageants, ont permis le passage à des échantillons plus complexes. Pour cela, deux échantillons biologiques ont pu être testés. Le premier, contenant des lysats plaquettaires et des billes calibrées, a montré des taux de capture plus hétérogènes. En effet, deux des trois analyses montrent une chute brutale de la capture des NP 480-OVA (taux 5 à 8 fois important que prévu) tandis qu'une troisième expérience se rapproche du taux observé en milieu synthétique. Toutefois, la capture des NP 140-CAS, hormis dans le cas d'une expérience, semble se rapprocher du taux de capture attendu. Ces résultats tendraient à montrer une perturbation de la capture des NP 480-OVA, en présence des lysats plaquettaires lors de deux expériences. Cependant, il semblerait que la filtration n'ait pas eu d'impact sur la capture comme le suggèrent les taux de capture pour la troisième expérience. Les expériences réalisées à partir de plasma sanguin confirment cette hypothèse. En effet, deux échantillons de plasma, l'un dilué 1000 fois et l'autre dilué 10 fois seulement, ont été préparés. Deux points sont importants à souligner : les taux de capture des NP 480-OVA et NP140-CAS sont similaires quelle que soit la dilution de l'échantillon biologique. Ces

résultats montrent la non influence de la concentration du milieu biologique sur le dispositif de tri. En effet, les taux des NP 480-OVA sont encore une fois inférieurs (environ 5 fois) au taux de capture en milieu synthétique et supérieurs (2 fois environ) dans le cas de la capture des NP 140-CAS. Toutefois, les similitudes des taux de capture en présence de PPL ou de plasma (dilué 1000 ou 10 fois) sont en faveur de cette hypothèse.

Ainsi, de par les résultats obtenus lors des premières expériences en connexion directe entre un module de tri et de capture, la preuve de concept d'un dispositif commun a été réalisée. Il a été démontré que cette connexion ne perturbe pas la filtration dans le dispositif de tri. Toutefois, des améliorations peuvent être amenées. En effet, la réalisation d'un support commun aux deux dispositifs pourrait permettre une connexion plus courte entre les deux modules. De plus, les conditions de débits peuvent être améliorées afin d'éliminer les potentiels risques de capture non spécifique sur la puce d'or.

CONCLUSION GENERALE

Il a été démontré que les EVs sont des espèces possédant un fort potentiel dans la médecine actuelle. En effet, de par leur présence dans l'ensemble des fluides biologiques, leur libération par un grand nombre de cellules de l'organisme, elles pourraient servir de biomarqueurs de nombreuses pathologies. Toutefois, il a été démontré que, malgré les nombreuses techniques actuelles de purification des EVs, celles-ci ne permettent pas de les séparer de façon optimale et sans étapes de préparation préalable à partir de fluides biologiques. En effet, leur hétérogénéité en termes de taille (les exosomes et microvésicules couvrant la gamme de 30 nm à 1000 nm de diamètre) rend cette étape délicate. Dans ce but, nous nous sommes fixés pour objectif de concevoir et de développer un module microfluidique adapté à l'isolement des EVs présents dans des échantillons biologiques complexes tels que le sang ou le plasma sanguin. Ce manuscrit a donc été structuré pour répondre au mieux à cette problématique. Ainsi, une description de l'ensemble des étapes menant à bien à ce projet (principe de fonctionnement du tri cellulaire, description des procédés de fabrication, opération de filtration) a été donné.

Afin de répondre à la demande de séparation par la taille des EVs, le principe fonctionnel retenu a été la filtration hydrodynamique. Cette technique, passive et non sujette au colmatage lors de son utilisation, permet, contrairement aux autres techniques de séparation, de travailler directement à partir d'échantillons denses et complexes. Afin d'appliquer ce principe de séparation par la taille, des dispositifs microfluidiques ont été imaginés. Grâce à l'expertise et aux plateformes présentes au LAAS-CNRS, la conception de dispositifs microfluidiques possédant 1, 10 et 100 canalisations secondaires et un rayon de coupure fixé à 350 nm, a été réalisée en appliquant deux types de technologies :

- La fabrication par laminages successifs de couche de films secs
- La fabrication par moulage PDMS

Les premières expériences menées, dans un premier temps, sur des échantillons synthétiques, ont permis de réaliser la preuve de concept de validation des laboratoires sur puces fabriqués. Pour cela, des nanoparticules sphériques, fluorescentes en polystyrènes, en silice ou en mélanine résines et possédant diverses tailles calibrées, en présence de PBS, ont été utilisées. De premières caractérisations réalisées en TRPS, ont établis des comparaisons entre les concentrations des solutions initiales, c'est-à-dire des solutions injectées dans les dispositifs de tri, et les concentrations après filtration. Ainsi, pour l'ensemble des nanoparticules de tailles inférieures au rayon de coupure, les taux de récupération obtenus sont de 100 %. Ceci montre une récupération totale des celles-ci après filtration. Aussi, pour les particules de taille supérieure, les taux de filtration de l'ordre de 98 % indiquent une bonne séparation des échantillons lors du passage dans les dispositifs de tri. Toutefois,

la filtration des billes de tailles supérieures au rayon de coupure n'étant pas totale, plusieurs hypothèses ont été proposées. Tout d'abord, d'un point de vue théorique, une réévaluation des rapports de débits nous a permis de mettre en évidence un écart significatif entre le rapport calculé approximativement à partir d'un profil parabolique et celui à partir des vitesses exactes. Cette réévaluation nous a permis de réajuster le nouveau rayon de coupure à 450 nm et non plus 350 nm. Aussi, il est important de soulever les difficultés liées à l'étude par TRPS. En effet, cette technique d'utilisation délicate et peu reproductible, ne permet pas de comparer les expériences. Toutefois, la validation à l'aide de milieu synthétique étant faite, le passage à des échantillons biologiques, plus complexes, et leurs caractérisations ont pu être réalisées. Pour cela, de nouveaux tests de filtration ont été effectués en utilisant des billes calibrées et des échantillons biologiques. La caractérisation en cytométrie de flux n'ayant pas donnée de résultats satisfaisants (présence d'artefacts, données numériques inexploitable), les caractérisations des échantillons contenant du sang et du plasma sanguin, à diverses concentrations, ont été réalisées à l'aide de cellules de Malassez. Les résultats obtenus montrent des taux de récupération (97 %) et de filtration (97 %) de l'ordre des taux en milieu synthétique. Ces taux similaires, nous indique que la filtration n'est pas impactée par la complexité de milieu à filtrer. Ainsi, la preuve d'utilisation de milieux biologiques, sans préparation préalable des échantillons, dans les dispositifs de tri est réalisée.

La mise en commun des dispositifs de tri et de capture, permettant l'isolement et la classification des EVs, a permis d'obtenir des résultats préliminaires, sur la plateforme miniaturisée imaginée par le projet ANR MADNESS. Ces premiers tests, réalisés en conditions idéales et en conditions biologiques (PPL et plasma sanguin), ont une fois de plus mis en avant, l'efficacité de filtration dans les milieux plus complexes.

Après ?

Le protocole de fabrication de dispositif de tri en 3D, utilisant les laminages successifs de films secs ayant montré quelques imperfections lors des étapes de capotage, il serait possible d'imaginer de nouveau procédé. Pour cela, la combinaison des technologies PDMS-DF pourrait être envisagée afin de rendre le scellement homogène, sans risque de bouchage ou d'effondrement des canalisations lors de la mise en contact d'un film sec sur lequel seraient reportées les canalisations et une fine couche de PDMS réticulée sur une lamelle de verre.

Aussi, afin d'améliorer les étapes de filtration dans les dispositifs de tri, il serait nécessaire d'imaginer de nouvelles générations de puce en s'appuyant sur des valeurs de rapport de débits correspondant aux valeurs des vitesses exactes. En effet, cette création permettra d'obtenir des dispositifs au rayon de coupure initialement souhaité de 350 nm. Des

modifications seront à prendre en compte pour minimiser les effets de perturbations pouvant augmenter le rayon de coupure. Pour cela, une attention toute particulière sur les motifs des canalisations devra être portée. Afin d'améliorer le fonctionnement des puces actuelles, la création d'un dispositif possédant une nouvelle structure (50 canalisations de chaque côté de la canalisation principale), permettrait une augmentation du débit à l'intérieur de cette dernière et donc de son rendement.

D'un point de vue de la caractérisation des échantillons, les méthodes utilisées au cours de ces travaux de thèse ont toutes montrées des limites dans leur utilisation. Des combinaisons de techniques pourraient permettre de mener à bien ces caractérisations d'espèces complexes.

Les expériences sur le LOC complet MADNESS ayant données des résultats préliminaires prometteurs, l'intégration des deux modules, au sein d'une plateforme unique, pourrait être envisagée. Ceci permettrait de réduire la connexion entre le module de tri et la plateforme et ainsi augmentée son efficacité. Cette étape pourrait permettre d'automatiser les étapes de manipulations.

ANNEXES

Annexe II.1 - Protocole de perçage des substrats de verre.

ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
1	Nettoyage du substrat de verre Plasma O ₂ 15 min à 800 W
2	Laminage PH-2040 70°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
3	Perçage à la sableuse Buse (0.46 mm), 2 bars, 5 secondes
4	Nettoyage du substrat Bain d'acétone puis bain H ₂ O ₂ /H ₂ SO ₄

Annexe II.2 - Protocole de fabrication des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires, en technologies DF.

ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
1	Nettoyage du substrat de verre Plasma O ₂ 15 min à 800 W
2	Laminage DF-1005 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
3	Photolithographie Insolation MA6 : 9 s, soft contact, 20 mW/cm ² (pleine plaque) PEB : 3 min à 100 °C
4	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
5	Laminage DF-1050 (deux laminage successifs) 100°C, 2.5 bars, 0.5 m/min
6	Photolithographie Insolation MA6 : 32 s, filtre, soft contact, 20 mW/cm ² (masque) PEB : 8 min à 100 °C Développement dans plusieurs baignoires de cyclohexanone (35 min) Rinçage à l'isopropanol

Annexe II.3 - Protocole des étapes de capotage à l'aide d'un substrat de verre, des dispositifs à 1 et 10 canalisations secondaires, en DF.

CAPOT DF	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
	1	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
	2	Laminage DF-1025 65°C, 2 bar, 1 m/min
	3	Photolithographie Insolation MA6 : 9 s, hard contact, 20 mW/cm ² (pleine plaque) PEB : recuit avec rampe de température (1 h)
CAPOT VERRE	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
	1	Nettoyage du substrat de verre Plasma O ₂ 15 min à 800 W
	2	Laminage DF-1005 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
	3	Scellement : Capotage Nanonex Pression : (30 PSI – 85 °C) Pression (60 PSI – 120 °C)

Annexe II.4 - Protocole complet de fabrication des dispositifs à 100 canalisations secondaires, en technologies DF.

	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
MONTAGE DE LA PARTIE FLUIDIQUE	1	Nettoyage du substrat de verre Plasma O ₂ 15 min à 800 W
	2	Laminage DF-1005 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
	3	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 340 mJ/cm ² (pleine plaque) PEB : 3 min à 100 °C
	4	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
	5	Laminage DF-1050 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
	6	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 375 mJ/cm ² (masque 1) PEB : 8 min à 100 °C Développement dans plusieurs bains de cyclohexanone (35 min) Rinçage à l'isopropanol
	7	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
	8	Laminage DF-1005 65°C, 2 bar, 1 m/min
	9	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 255 mJ/cm ² (masque 2) PEB : 100 °C avec rampe de température (1h) Développement dans bain de cyclohexanone (5 min) Rinçage à l'isopropanol
	10	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
	11	Laminage DF-1005 65°C, 2 bar, 1 m/min
	12	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 340 mJ/cm ² PEB : 100 °C avec rampe de température (1h)

	13	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W (avec cage de Faraday)
	1'	Fonctionnalisation de surface Plasma O ₂ 2 min à 200 W
	2'	Laminage DF-1025 65°C, 2 bar, 1 m/min
	3'	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 180 mJ/cm ² PEB : 100 °C avec rampe de température (1h)
CAPOT VERRE	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
	1''	Nettoyage du substrat de verre Plasma O ₂ 15 min à 800 W
	2''	Laminage DF-1005 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
	14	Scellement : Capotage Nanonex Pression 1 : (30°C – 90°C et 36 PSI – 70 PSI) Pression 2 : (120°C – 120°C et 60 PSI – 70 PSI)

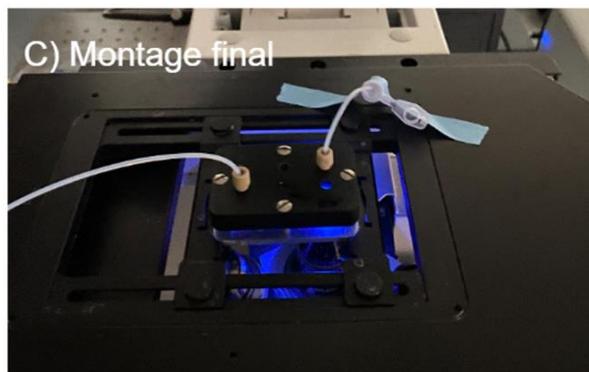
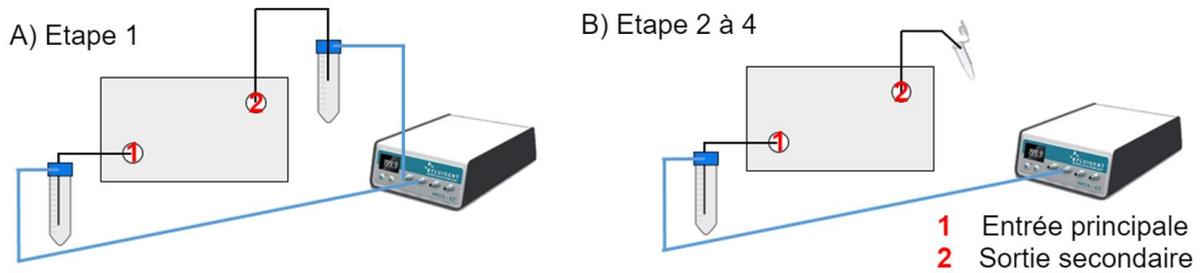
Annexe II.5 - Protocole complet de fabrication des dispositifs à 100 canalisations secondaires, en technologies PDMS.

ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ÉTAPE
1	Nettoyage du substrat de silicium Plasma O ₂ 5 min à 800 W
2	Dépôt du promoteur d'adhérence Tournette : accélération : 4000, vitesse : 4000 tr/min, 30s Recuit de 3 min à 100 °C
3	Laminage DF-1005 (deux fois) 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
4	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 425 mJ/cm ² , hard contact (masque niveau 1) PEB : 4 min à 100 °C
5	Laminage DF-1050 (deux fois) 100°C, 2.5 bar, 0.5 m/min
6	Photolithographie Insolation MA6 Gen4 : 270 mJ/cm ² , hard contact (masque niveau 2) PEB : 8 min à 100 °C Développement dans plusieurs bains de cyclohexanone (20 min) Rinçage à l'isopropanol
7	Dépôt Dépôt FDTS et SiO ₂ pendant 5 min

Annexe II.6 - Protocole de moulage et de collage des dispositifs à 100 canalisations PDMS.

	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ETAPE
MOULAGE PDMS	1	Préparation du PDMS Monomère – élastomère 10 % Dégazage sous vide du mélange (1h min)
	2	Moulage du PDMS sur moule Si-DF dans boîte de Pétri Dégazage sous vide du mélange (1h min)
	3	Réticulation du PDMS Étuve à 60 °C (1/2 journée)
	ÉTAPE	DESCRIPTION DE L'ETAPE
COLLAGE VERRE- PDMS	1	Nettoyage à l'isopropanol Des puces PDMS et des capots de verre
	2	Plasma O₂ 45 s, 0.25, 100 %
	3	Mise en contact du PDMS et du verre Étuve à 60 °C (1/2 journée)

Annexe III.1 - Schématisation des différentes étapes de branchement du dispositif microfluidique. Photographie du montage et de branchement lors des analyses. Protocole d'injection de prétraitement.



ÉTAPES	CONDITION D'UTILISATION
1	Injection d'éthanol par la sortie secondaire 1 bar – 2 min
2	Injection d'éthanol par l'entrée principale 1 bar – 1 min
3	Traitement de surface par PBS-Tween 20 (0.1%) par l'entrée principale 200 mbar – 1 h

Annexe III.2 - Protocole complet des étapes d'injection des solutions dans les dispositifs à 100 canalisations secondaires.

ÉTAPES	CONDITION D'UTILISATION
1	Injection d'éthanol par la sortie secondaire 1 bar – 2 min
2	Injection d'éthanol par l'entrée principale 1 bar – 1 min
3	Traitement de surface par PBS-Tween20 (0.1%) par l'entrée principale 200 mbar – 1 h
4	Injection de l'échantillon à filtrer par l'entrée principale 1 bar – 40 min
5	Rinçage au PBS-Tween20 (0.1%) par l'entrée principale 1 bar – 10 min

Annexe IV-1 – Protocole de rinçage de la puce d'or

ÉTAPES	CONDITION D'UTILISATION
1	Injection de glutaraldéhyde (0.5%) Pression : 20 mbar – 5 min
2	Injection d'eau – Pression 20 mbar – 5 min

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ZLOTOGORSKI-HURVITZ, Ayelet, DAYAN, Dan, CHAUSHU, Gavriel, *et al.* Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2015, vol. 63, no 3, p. 181-189.
- [2] OGAWA, Yuko, KANAI-AZUMA, Masami, AKIMOTO, Yoshihiro, *et al.* Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, vol. 31, no 6, p. 1059-1062.
- [3] KELLER, S., RUPP, C., STOECK, A., *et al.* CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney international*, 2007, vol. 72, no 9, p. 1095-1102.
- [4] CHUN-YAN, Lv, ZI-YI, Zhao, TIAN-LIN, Yang, *et al.* Liquid biopsy biomarkers of renal interstitial fibrosis based on urinary exosome. *Experimental and molecular pathology*, 2018, vol. 105, no 2, p. 223-228.
- [5] ASEA, Alexzander, JEAN-PIERRE, Claudel, KAUR, Punit, *et al.* Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of reproductive immunology*, 2008, vol. 79, no 1, p. 12-17.
- [6] YANG, Mei, SONG, Dahe, CAO, Xueyan, *et al.* Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food research international*, 2017, vol. 92, p. 17-25.
- [7] ADMYRE, Charlotte, JOHANSSON, Sara M., QAZI, Khaleda Rahman, *et al.* Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *The Journal of immunology*, 2007, vol. 179, no 3, p. 1969-1978.
- [8] MADISON, Marisa N., ROLLER, Richard J., *et* OKEOMA, Chioma M. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*, 2014, vol. 11, no 1, p. 1-16.
- [9] BARCELÓ, Maria, CASTELLS, Manel, BASSAS, Lluís, *et al.* Semen miRNAs contained in exosomes as non-invasive biomarkers for prostate cancer diagnosis. *Scientific reports*, 2019, vol. 9, no 1, p. 1-16.
- [10] SMITH, Johanna A. *et* DANIEL, Rene. Human vaginal fluid contains exosomes that have an inhibitory effect on an early step of the HIV-1 life cycle. *AIDS (London, England)*, 2016, vol. 30, no 17, p. 2611.

- [11] DONG, Bing, WANG, Chao, ZHANG, Jing, *et al.* Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate the inflammation of severe steroid-resistant asthma by reshaping macrophage polarization. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, vol. 12, no 1, p. 1-17.
- [12] ADMYRE, C., GRUNEWALD, J., THYBERG, J., *et al.* Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *European Respiratory Journal*, 2003, vol. 22, no 4, p. 578-583
- [13] VAN NIEL, Guillaume, D'ANGELO, Gisela, et RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2018, vol. 19, no 4, p. 213.
- [14] YÁÑEZ-MÓ, María, SILJANDER, Pia R.-M., ANDREU, Zoraida, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 2015, vol. 4, no 1, p. 27066.
- [15] SHAH, Ravi, PATEL, Tushar, et FREEDMAN, Jane E. Circulating extracellular vesicles in human disease. *New England Journal of Medicine*, 2018, vol. 379, no 10, p. 958-966.
- [16] BEBELMAN, Maarten P., SMIT, Martine J., PEGTEL, D. Michiel, *et al.* Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 2018, vol. 188, p. 1-11.
- [17] JABALEE, James, TOWLE, Rebecca, et GARNIS, Cathie. The role of extracellular vesicles in cancer: cargo, function, and therapeutic implications. *Cells*, 2018, vol. 7, no 8, p. 93.
- [18] DICKHOUT, Annemiek et KOENEN, Rory R. Extracellular vesicles as biomarkers in cardiovascular disease; chances and risks. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2018, vol. 5, p. 113.
- [19] JANSEN, Felix, NICKENIG, Georg, et WERNER, Nikos. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: potential applications in diagnosis, prognosis, and epidemiology. *Circulation research*, 2017, vol. 120, no 10, p. 1649-1657.
- [20] BOULANGER, Chantal M., LOYER, Xavier, RAUTOU, Pierre-Emmanuel, *et al.* Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nature reviews cardiology*, 2017, vol. 14, no 5, p. 259-272.

- [21] KARPMAN, Diana, STÅHL, Anne-lie, et ARVIDSSON, Ida. Extracellular vesicles in renal disease. *Nature Reviews Nephrology*, 2017, vol. 13, no 9, p. 545-562.
- [22] POMATTO, Margherita AC, GAI, Chiara, BUSSOLATI, Benedetta, *et al.* Extracellular vesicles in renal pathophysiology. *Frontiers in molecular biosciences*, 2017, vol. 4, p. 37.
- [23] WATSON, Luke S., HAMLETT, Eric D., STONE, Tyler D., *et al.* Neuronally derived extracellular vesicles: an emerging tool for understanding Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 2019, vol. 14, no 1, p. 1-9.
- [24] RUAN, Zhi, PATHAK, Dhruva, VENKATESAN KALAVAI, Srinidhi, *et al.* Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain*, 2021, vol. 144, no 1, p. 288-309.
- [25] MALLOCI, Marine, PERDOMO, Liliana, VEERASAMY, Maëva, *et al.* Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 2019, vol. 30, no 6, p. 813-856.
- [26] VAN DER POL, Edwin, BÖING, Anita N., HARRISON, Paul, *et al.* Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*, 2012, vol. 64, no 3, p. 676-705.
- [27] AGGELER, Paul M., WHITE, Sidney G., GLENDENING, Mary Beth, *et al.* Plasma thromboplastin component (PTC) deficiency: a new disease resembling hemophilia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1952, vol. 79, no 4, p. 692-694.
- [28] WOLF, Peter. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 1967, vol. 13, no 3, p. 269-288.
- [29] STAM, Janine, BARTEL, Sabine, BISCHOFF, Rainer, *et al.* Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *Journal of Chromatography B*, 2021, p. 122604.
- [30] JOHNSTONE, Rose M., ADAM, Mohammed, HAMMOND, J. R., *et al.* Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 1987, vol. 262, no 19, p. 9412-9420.
- [31] JUNG, Min Kyo *et* MUN, Ji Young. Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2018, no 131.

- [32] VLASSOV, Alexander V., MAGDALENO, Susan, SETTERQUIST, Robert, *et al.* Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2012, vol. 1820, no 7, p. 940-948.
- [33] CONDE-VANCELLS, Javier, RODRIGUEZ-SUAREZ, Eva, EMBADE, Nieves, *et al.* Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of proteome research*, 2008, vol. 7, no 12, p. 5157-5166.
- [34] JUNKAR, Ita, ŠUŠTAR, Vid, FRANK, Mojca, *et al.* Blood and synovial microparticles as revealed by atomic force and scanning electron microscope. *The Open Autoimmunity Journal*, 2009, vol. 1, no 1.
- [35] MIRANDA, Kevin C., BOND, Daniel T., MCKEE, Mary, *et al.* Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney international*, 2010, vol. 78, no 2, p. 191-199.
- [36] GILLIGAN, Katie E. et DWYER, Róisín M. Engineering exosomes for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 2017, vol. 18, no 6, p. 1122.
- [37] ZHOU, Biting, XU, Kailun, ZHENG, Xi, *et al.* Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 2020, vol. 5, no 1, p. 1-14.
- [38] "ISEV : International Society for Extracellular Vesicles" disponible en ligne : <https://www.isev.org/> (accède le 10/07/2021)
- [39] ROYO, Felix, THÉRY, Clotilde, FALCÓN-PÉREZ, Juan M., *et al.* Methods for separation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey performed by the ISEV rigor and standardization subcommittee. *Cells*, 2020, vol. 9, no 9, p. 1955.
- [40] ZERINGER, Emily, BARTA, Timothy, LI, Mu, *et al.* Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015, vol. 2015, no 4, p. pdb. top074476.
- [41] PARISET, Eloise, AGACHE, Vincent, et MILLET, Arnaud. Extracellular vesicles: isolation methods. *Advanced biosystems*, 2017, vol. 1, no 5, p. 1700040.

- [42] GARDINER, Chris, VIZIO, Dolores Di, SAHOO, Susmita, *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*, 2016, vol. 5, no 1, p. 32945.
- [43] BATRAKOVA, Elena V. et KIM, Myung Soo. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2015, vol. 219, p. 396-405.
- [44] BÖING, Anita N., VAN DER POL, Edwin, GROOTEMAAT, Anita E., *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of extracellular vesicles*, 2014, vol. 3, no 1, p. 23430.
- [45] MONGUIÓ-TORTAJADA, Marta, GÁLVEZ-MONTÓN, Carolina, BAYES-GENIS, Antoni, *et al.* Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, vol. 76, no 12, p. 2369-2382.
- [46] MOL, Emma A., GOUMANS, Marie-José, DOEVENDANS, Pieter A., *et al.* Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017, vol. 13, no 6, p. 2061-2065.
- [47] LOZANO-RAMOS, Inés, BANCU, Ioana, OLIVEIRA-TERCERO, Anna, *et al.* Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of extracellular vesicles*, 2015, vol. 4, no 1, p. 27369.
- [48] LIBREGTS, S. F. W. M., ARKESTEIJN, G. J. A., NÉMETH, Andrea, *et al.* Flow cytometric analysis of extracellular vesicle subsets in plasma: impact of swarm by particles of non-interest. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2018, vol. 16, no 7, p. 1423-1436.
- [49] GOUGH, Jennifer, JONES, Michael, MORRISON, Damian, *et al.* Using High Speed/High Resolution Size Exclusion Chromatography Separation of Polymeric Materials with Light Scattering Detection.
- [50] KANG, Dukjin, OH, Sunok, AHN, Sung-Min, *et al.* Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 2008, vol. 7, no 8, p. 3475-3480.

- [51] YANG, Joon Seon, LEE, Jong Cheol, BYEON, Seul Kee, *et al.* Size dependent lipidomic analysis of urinary exosomes from patients with prostate cancer by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 2017, vol. 89, no 4, p. 2488-2496.
- [52] WAGNER, Michael, HOLZSCHUH, Stephan, TRAEGER, Anja, *et al.* Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine. *Analytical chemistry*, 2014, vol. 86, no 11, p. 5201-5210.
- [53] ZHANG, Haiying, FREITAS, Daniela, KIM, Han Sang, *et al.* Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, 2018, vol. 20, no 3, p. 332-343.
- [54] LI, Pin, KASLAN, Melisa, LEE, Sze Han, *et al.* Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, 2017, vol. 7, no 3, p. 789.
- [55] HEINEMANN, Mitja L., ILMER, Matthias, SILVA, Leslie P., *et al.* Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1371, p. 125-135.
- [56] YANG, Dongbin, ZHANG, Weihong, ZHANG, Huanyun, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020, vol. 10, no 8, p. 3684.
- [57] NORDIN, Joel Z., LEE, Yi, VADER, Pieter, *et al.* Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015, vol. 11, no 4, p. 879-883.
- [58] GUDBERGSSON, Johann Mar, JOHNSEN, Kasper Bendix, SKOV, Martin Najbjerg, *et al.* Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology*, 2016, vol. 68, no 4, p. 579-592.
- [59] CAMPOY, Irene, LANAU, Lucia, ALTADILL, Tatiana, *et al.* Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *Journal of translational medicine*, 2016, vol. 14, no 1, p. 1-12.

- [60] CVJETKOVIC, Aleksander, LÖTVALL, Jan, et LÄSSER, Cecilia. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 2014, vol. 3, no 1, p. 23111.
- [61] MOMEN-HERAVI, Fatemeh, BALAJ, Leonora, ALIAN, Sara, *et al.* Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Frontiers in physiology*, 2012, vol. 3, p. 162.
- [62] MOMEN-HERAVI, Fatemeh, BALAJ, Leonora, ALIAN, Sara, *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles.
- [63] THÉRY, Clotilde, AMIGORENA, Sebastian, RAPOSO, Graça, *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 2006, vol. 30, no 1, p. 3.22. 1-3.22. 29.
- [64] SOARES MARTINS, Tânia, CATITA, José, MARTINS ROSA, Ilka, *et al.* Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PloS one*, 2018, vol. 13, no 6, p. e0198820.
- [65] ZHAO, Lei, YU, Jing, WANG, Jing, *et al.* Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *Journal of Cancer*, 2017, vol. 8, no 7, p. 1145.
- [66] DING, Meng, WANG, Cheng, LU, Xiaolan, *et al.* Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2018, vol. 410, no 16, p. 3805-3814.
- [67] ZAROVNI, Natasa, CORRADO, Antonietta, GUAZZI, Paolo, *et al.* Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*, 2015, vol. 87, p. 46-58.
- [68] LOGOZZI, Mariantonia, DE MILITO, Angelo, LUGINI, Luana, *et al.* High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one*, 2009, vol. 4, no 4, p. e5219.

- [69] LOGOZZI, Mariantonia, DI RAIMO, Rossella, MIZZONI, Davide, *et al.* Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. *Methods in Enzymology*, 2020.
- [70] SACKMANN, Eric K., FULTON, Anna L., et BEEBE, David J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 2014, vol. 507, no 7491, p. 181-189.
- [71] EVANDER, Mikael, GIDLÖF, Olof, OLDE, Björn, *et al.* Non-contact acoustic capture of microparticles from small plasma volumes. *Lab on a Chip*, 2015, vol. 15, no 12, p. 2588-2596.
- [72] ZHANG, Peiran, BACHMAN, Hunter, OZCELIK, Adem, *et al.* Acoustic microfluidics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2020, vol. 13, p. 17-43.
- [73] LAURELL, Thomas, PETERSSON, Filip, et NILSSON, Andreas. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles. *Chemical Society Reviews*, 2007, vol. 36, no 3, p. 492-506.
- [74] WU, Mengxi, OUYANG, Yingshi, WANG, Zeyu, *et al.* Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, vol. 114, no 40, p. 10584-10589.
- [75] HUANG, Lotien Richard, COX, Edward C., AUSTIN, Robert H., *et al.* Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science*, 2004, vol. 304, no 5673, p. 987-990.
- [76] SMITH, Joshua T., WUNSCH, Benjamin H., DOGRA, Navneet, *et al.* Integrated nanoscale deterministic lateral displacement arrays for separation of extracellular vesicles from clinically-relevant volumes of biological samples. *Lab on a Chip*, 2018, vol. 18, no 24, p. 3913-3925.
- [77] WUNSCH, Benjamin H., SMITH, Joshua T., GIFFORD, Stacey M., *et al.* Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm. *Nature nanotechnology*, 2016, vol. 11, no 11, p. 936-940.
- [78] LAKI, András J., BOTZHEIM, Lilla, IVÁN, Kristóf, *et al.* Separation of microvesicles from serological samples using deterministic lateral displacement effect. *BioNanoScience*, 2015, vol. 5, no 1, p. 48-54.

- [79] COLLINS, David J., ALAN, Tuncay, et NEILD, Adrian. Particle separation using virtual deterministic lateral displacement (vDLD). *Lab on a Chip*, 2014, vol. 14, no 9, p. 1595-1603.
- [80] BEECH, Jason P., JÖNSSON, Peter, et TEGENFELDT, Jonas O. Tipping the balance of deterministic lateral displacement devices using dielectrophoresis. *Lab on a Chip*, 2009, vol. 9, no 18, p. 2698-2706.
- [81] DEVENDRA, Raghavendra et DRAZER, German. Gravity driven deterministic lateral displacement for particle separation in microfluidic devices. *Analytical chemistry*, 2012, vol. 84, no 24, p. 10621-10627.
- [82] GARDINER, Chris, VIZIO, Dolores Di, SAHOO, Susmita, *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*, 2016, vol. 5, no 1, p. 32945.
- [83] YAMADA, Masumi et SEKI, Minoru. Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab on a Chip*, 2005, vol. 5, no 11, p. 1233-1239.
- [84] FOUET, Marc, MADER, M.-A., IRAÏN, Sabri, *et al.* Filter-less submicron hydrodynamic size sorting. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16, no 4, p. 720-733.
- [85] COURSON, Rémi, CARGOU, Sébastien, CONÉDÉRA, Véronique, *et al.* Low-cost multilevel microchannel lab on chip: DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no 97, p. 54847-54853.
- [86] COURSON, Rémi. DF-1000 series: une gamme de film sec photosensible pour les MEMS, BioMEMS.. 2015.
- [87] BECKER, Holger et GÄRTNER, Claudia. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, vol. 390, no 1, p. 89-111.
- [88] PILLEMONT, Lyne, GUNEYSU, Daniel, ELIE-CAILLE, Céline, *et al.* A generic Microfluidic Approach for Deciphering Nanoscale biovesicles properties. In : *3rd Caparica Christmas Conference on sample Treatment*. 2018.

[89] "Fiche de données sécurité du Tween20", disponible en ligne <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/sds/sial/p1379> accédé le 16/07/21.

[90] "qNano - User manual - IZON", disponible en ligne : https://cdn.brandfolder.io/ZPO3JAFV/as/q70e90-7r9qew-e55wb8/qNano_User_Manual.pdf (accédé le 02/07/2021).

[91] « Le plasma sanguin : une ressource fondamentale, indispensable et précieuse » disponible en ligne : <https://en.efs.sante.fr/le-plasma-sanguin-une-ressource-fondamentale-indispensable-et-precieuse> (accédé le 30.08/2021)

[92] "BD LSRFortessa X-20 – Cell Analyzer – User's Guide", disponible en ligne : <https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD-LSRFortessa-X20-Cell-Analyzer-User-Guide.pdf> (accédé le 05/07/2021).

[93] "BD LSRFortessa X-20 Performance without peer choice without compromise" disponible en ligne : https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/bd_lsrfortessa_brochure_resource.pdf (accédé le 05/07/2021).

[94] NIVEDITA, Nivedita et PAPAUTSKY, Ian. Continuous separation of blood cells in spiral microfluidic devices. *Biomicrofluidics*, 2013, vol. 7, no 5, p. 054101.

[95] HOLM, Stefan H., BEECH, Jason P., BARRETT, Michael P., *et al.* Simplifying microfluidic separation devices towards field-detection of blood parasites. *Analytical Methods*, 2016, vol. 8, no 16, p. 3291-3300.

[96] GUNETTI, Monica, CASTIGLIA, Sara, RUSTICHELLI, Deborah, *et al.* Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. *Journal of translational medicine*, 2012, vol. 10, no 1, p. 1-12.

[97] OBEID, Sameh, CEROI, Adam, MOUREY, Guillaume, *et al.* Development of a NanoBioAnalytical platform for " on-chip" qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, vol. 93, p. 250-259.

- [98] OBEID, Sameh, SUNG, Pei-Shan, LE ROY, Benoit, et al. NanoBioAnalytical characterization of extracellular vesicles in 75-nm nanofiltered human plasma for transfusion: A tool to improve transfusion safety. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, vol. 20, p. 101977
- [99] Lausted,, Hu,Z.,Hood,L.,Campbell,C.T.,2009.Comb.Chem.HighThroughput Screen. 12,741–751.
- [100] RÉMY-MARTIN, Fabien. Développement d'une plateforme pour l'analyse sur puce d'un biomarqueur par couplage des technologies de résonance des plasmons de surface et de spectrométrie de masse. 2013. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté.
- [101] OBEID, Sameh. Analyse quantitative et qualitative sur puce de vésicules extracellulaires en milieux complexes au sein d'une plateforme nanobioanalytique. 2017. Thèse de doctorat. Université Bourgogne Franche-Comté.
- [102] REMY-MARTIN, Fabien, EL OSTA, Marven, LUCCHI, Giralaine, et al. Surface plasmon resonance imaging in arrays coupled with mass spectrometry (SUPRA–MS): proof of concept of on-chip characterization of a potential breast cancer marker in human plasma. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012, vol. 404, no 2, p. 423-432.
- [103] WIDYANINGRUM, Rifa, BURNOUF, Thierry, NEBIE, Ouada, et al. A purified human platelet pellet lysate rich in neurotrophic factors and antioxidants repairs and protects corneal endothelial cells from oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, vol. 142, p. 112046.
- [104] KONOSHENKO, Maria Yu, LEKCHNOV, Evgeniy A., VLASSOV, Alexander V., et al. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *BioMed research international*, 2018, vol. 2018.
- [105] ZHAO, Zheng, WIJERATHNE, Harshani, GODWIN, Andrew K., et al. Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs). *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*, 2021, vol. 2, no 1, p. 80-103.

PUBLICATIONS

Les conférences réalisées pendant la thèse sont données ci-dessous

PILLEMONT, Lyne, GUNEYSU, Daniel, ELIE-CAILLE, Céline, et al. A generic Microfluidic Approach for Deciphering Nanoscale biovesicles properties. In: 3rd Caparica Christmas Conference on sample Treatment. 2018.

PILLEMONT, Lyne, GUNEYSU, Daniel, ELIE-CAILLE, Céline, *et al.* Towards on-chip EVs separation: a lab-on-chip approach. In: *Annual meeting of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2019)*. 2019. p. PS04. 10.

Accepted : “A low-cost and easy to use sorting device for the separation of extracellular vesicles from complex fluids”, 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021).